

α -Glucanstoffwechsel in
Bacillus amyloliquefaciens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

HERBERT URLAUB
aus Schwerte/Ruhr

Marburg/Lahn 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

α -Glucanstoffwechsel in
Bacillus amyloliquefaciens

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

HERBERT URLAUB
aus Schwerte/Ruhr

Marburg/Lahn 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Von dem Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 25. 10. 1977

Tag der mündlichen Prüfung: 2. 11. 1977

Berichterstatter: Dozent Dr. G. Wöber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl



Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Zusammenfassung	1
2. Liste der in der Arbeit zitierten Enzyme	5
3. Einleitung	6
3.1. Enzyme und Enzymprodukte des α -Glucan- abbaues	6
3.2. α -Glucanverwertung in Bakterien	9
3.3. Sekretion extrazellulärer Enzyme und Polysaccharide	11
3.4. Reservekohlehydrate	12
4. Ziele der Arbeit	14
5. Material und Methoden	16
5.1. Chemikalien und Hilfsenzyme	16
5.2. Mikroorganismen und Kulturbedingungen	18
5.3. Analytische Methoden	18
5.3.1. Enzymtests	18
5.3.2. Allgemeine Bestimmungsmethoden	21
5.3.3. Isolierung von Glykogen	25
5.3.4. Bestimmung von Radioaktivität in Glykogen	27
6. Ergebnisse	29
6.1.1. Enzyme der α -Glucanverwertung in <u>E. coli</u>	29
6.1.2. Enzyme der α -Glucanverwertung in <u>B. amyloliquefaciens</u> 23350 und <u>B. subtilis</u> 6051 und 6633	30
6.1.3. Physiologie der α -Glucosidasebil- dung in <u>B. amyloliquefaciens</u>	33
6.1.4. Subzelluläre Lokalisation von α -Glucosidase	38
6.1.5. Solubilisierung der membrangebun- denen α -Glucosidase	42

	Seite
6.1.6. Reinigung der α -Glucosidase	47
6.1.7. Kriterien für die Reinheit der gereinigten α -Glucosidase	55
6.1.8. Eigenschaften der gereinigten α -Glucosidase	58
6.2. Extrazelluläre Polysaccharide von <u>B. amyloliquefaciens</u>	62
6.2.1. Zeitlicher Verlauf der Sekretion extrazellulärer Polysaccharide und Proteine mit und ohne 2-Desoxy-D-glucose während des Wachstums von <u>B. amyloliquefaciens</u>	63
6.2.2. Reinigung von extrazellulären Polysacchariden aus dem Kulturmedium von <u>B. amyloliquefaciens</u>	70
6.2.3. Reinigung der spezifischen Polysaccharide von Isoamylase und α -Amylase aus dem Kulturmedium	74
6.2.4. Zusammensetzung des Polysaccharides aus dem Kulturmedium von <u>B. amyloliquefaciens</u>	79
6.3. Aspekte des endogenen α -Glucanstoffwechsels in <u>B. amyloliquefaciens</u>	86
6.3.1. Isolierung und Charakterisierung von Glykogen aus <u>B. amyloliquefaciens</u>	87
6.3.2. Akkumulierung von Glykogen in Zellen von <u>B. amyloliquefaciens</u>	90
6.3.3. Mobilisierung von Glykogen	92
6.3.4. Turnover von Glykogen	96
7. Diskussion	99
7.1. Enzyme der α -Glucanverwertung in <u>E. coli</u> 8729, <u>B. subtilis</u> 6051 und 6633 und <u>B. amyloliquefaciens</u> 23350	99

7.2.	α -Glucosidase ein membrangebundenes Enzym	100
7.3.	Vergleich der <u>B. amyloliquefaciens</u> α -Glucosidase mit ähnlichen Enzymen verschiedenen Ursprungs	102
7.4.	Physiologische Funktion der α -Glucosidase beim α -Glucanabbau in <u>B. amyloliquefaciens</u>	105
7.5.	Sekretion extrazellulärer Polysaccharide	106
7.6.	Reservekohlehydrat in <u>B. amyloliquefaciens</u>	108
7.7.	Turnover von Glykogen in <u>B. amyloliquefaciens</u>	110
8.	Abschließende Zusammenfassung	110
9.	Literaturzitate	112



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zusammenfassung

Den Enzymen der α -Glucanverwertung in Escherichia coli 8829 - extrazellulär α -Amylase und Pullulanase bzw. intrazellulär Amylomaltase und Maltodextrin-Phosphorylase - wurden die Enzyme, die mutmaßlich für die α -Glucanverwertung in B. amyloliquefaciens verantwortlich sind, gegenüber gestellt. Im Kulturmedium dieses Organismus findet man α -Amylase und Isoamylase, die unter physiologischen Bedingungen während der exponentiellen Wachstumsphase in das Medium abgegeben werden. Intrazellulär konnte eine α -Glucosidase nachgewiesen werden, jedoch nicht die Enzyme Amylomaltase oder Maltodextrin-Phosphorylase. Die Ergebnisse für das Vorhandensein oder Fehlen der Enzyme der α -Glucanverwertung in B. amyloliquefaciens stimmen mit der Ausnahme von extrazellulärer Isoamylase auch mit den Befunden an B. subtilis 6051 und 6633 überein. α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens ist ein induzierbares Enzym, das ausschließlich membrangebunden gefunden wurde, wenn Sphäroplasten lysiert und durch differentielle Zentrifugation aufgetrennt wurden. Weitere Hinweise darauf, daß α -Glucosidase in B. amyloliquefaciens ein membrangebundenes Enzym ist, wurden durch Solubilisierungsexperimente erhalten. Salzlösungen oder EDTA allein waren nicht in der Lage, α -Glucosidase von Membranen abzulösen. Obwohl die größte Menge an α -Glucosidaseaktivität mit Natriumcholat (pH 8,0; 0,4 M NaCl) solubilisiert wurde, nahm die biologische Aktivität drastisch ab, wenn Konzentrationen über 2 mg/ml Detergens eingesetzt wurden.

α -Glucosidase wurde aus Zellhomogenaten von B. amylo-liquefaciens mittels Molekularsieb-, Ionenaustauscherchromatographie, anschließender Solubilisierung von α -Glucosidase enthaltenden Vesikeln mit Tween 85 und nochmaliger Molekularsieb- und Ionenaustauscherchromatographie gereinigt. Bei einem Reinigungsfaktor von 347 wurde nach SDS-Gelelektrophorese bei Anfärbung auf Protein eine einzelne Bande gefunden. Das gereinigte Enzym war frei von anderen amylolytischen Enzymaktivitäten.

Gereinigte α -Glucosidase hydrolisierte p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid und Saccharose sehr schnell. Maltose, Maltotriose, Isomaltose und Isomaltotriose wurden wesentlich langsamer hydrolisiert, wohingegen Methyl- α -D-glucopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid und polymere α -Glucane von dem Enzym nicht angegriffen wurden. Das pH-Optimum der Reaktion lag bei pH 6,8 und das Enzym war von pH 6,2 bis pH 7,0 stabil. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Molekulargewicht zu $27\,000 \pm 1\,000$ Daltons bestimmt.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird vorgeschlagen, daß α -Glucosidase am endogenen Stoffwechsel von extrazellulären, als Kohlehydratquelle im Medium vorgegebenen α -Glucanen beteiligt ist. Als Enzyme, die für den Abbau von α -Glucanen im Medium verantwortlich sind, können α -Amylase und Isoamylase angesehen werden. Durch den gleichzeitigen Angriff dieser Enzyme, die ins Kulturmedium sezerniert werden, werden α -Glucane vollständig

zu Maltose und höheren Maltodextrinen abgebaut. Diese Maltodextrine werden dann mutmaßlich durch die membran-gebundene α -Glucosidase hydrolisiert.

Zusammen mit den extrazellulären Enzymen werden während der exponentiellen Wachstumsphase Polysaccharide in das Nährmedium sezerniert. Die Sekretion extrazellulärer Polysaccharide kann durch Zugabe von 2-Desoxy-D-glucose zum Nährmedium inhibiert werden. Obwohl die Biosynthese extrazellulärer Proteine durch Zugabe von 2-Desoxyglucose insgesamt stimuliert wird, läßt sich die Sekretion von Isoamylase vollständig und die Sekretion von α -Amylase partiell bei einer Konzentration von 900 $\mu\text{g/ml}$ Desoxyglucose inhibieren. Die Inhibierung der Enzymsekretion kann auf eine Inhibierung der Biosynthese spezifischer Polysaccharide zurückgeführt werden. Aus je 3 Ltr. Kulturen wurde kosezerniertes Polysaccharid gereinigt. Die Kultur ohne Desoxyglucose ergab eine Ausbeute von 840 mg und die Kultur mit Desoxyglucose eine Ausbeute von 760 mg proteingebundenes Polysaccharid. In den Polysacchariden konnten Galaktose, Glucose, Mannose, Rhamnose, Galaktosamin, Glucosamin und Glucuronsäure nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Inhibierung der Polysaccharid- und der Proteinsekretion läßt den Schluß zu, daß sezerniertes Polysaccharid eine Voraussetzung für die Proteinsekretion ist.

Kommt das Wachstum der Bakterien nach Ende der exponentiellen Wachstumsphase und damit die Biosynthese

extrazellulärer Proteine zum Erliegen, wird in die Zelle transportierte Glucose teilweise als Glykogen akkumuliert. Voraussetzung für die Akkumulation von Glykogen in den Zellen von B. amyloliquefaciens während der frühen stationären Wachstumsphase sind stickstofflimitierende Wachstumsbedingungen und das Vorhandensein eines Überschusses an Kohlenstoffquelle im Nährmedium. Der Glykogengehalt der Zellen hing von der Menge der dem Medium zugesetzten Stickstoffquelle ab. Das Verhältnis Glykogen zu Zellprotein nahm in dem Verhältnis zu, wie die Menge an Stickstoffträger im Nährmedium reduziert wurde. An gereinigtem B. amyloliquefaciens Glykogen wurde die durchschnittliche Kettenlänge zu 8,7 Glucoseeinheiten bestimmt; bis zu 26,5 % des Glykogenmoleküls waren dem Angriff von β -Amylase zugänglich. Unter zeitweiligen Hungerbedingungen des Bakteriums oder wenn das Zellwachstum nach Zugabe einer Stickstoffquelle wieder aufgenommen wurde, erfolgte ein rascher Abbau des als Kohlenstoff- und/oder Energiequelle dienenden Glykogens. Durch "pulse chase"-labelling "-Experimente konnte ein Turnover des Glykogens nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Experimente werden dahingehend interpretiert, daß Glykogen in B. amyloliquefaciens die Rolle einer Reservesubstanz spielt. Zusätzlich scheinen die relativen Geschwindigkeiten der Synthese und des Abbaues von Glykogen strikt reguliert zu sein.

2. Enzyme

α -Amylase oder 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase,
EC 3.2.1.1

Isoamylase oder Glykogen-6-Glucanohydrolase,
EC 3.2.1.68

Pullulanase oder Pullulan-6-Glucanohydrolase,
EC 3.2.1.41

β -Amylase oder 1,4- α -D-Glucan Maltahydrolase,
EC 3.2.1.2

α -Glucosidase oder α -D-Glucosid Glucohydrolase,
EC 3.2.1.20

Glucoamylase oder 1,4- α -D-Glucan Glucohydrolase,
EC 3.2.1.3

Amylomaltase oder 1,4- α -D-Glucan: 1,4- α -D-Glucan
4- α -Glucanotransferase
EC 2.4.1.25

Maltodextrin-Phosphorylase oder 1,4- α -D-Glucan:
Orthophosphat α -Glucosyltrans-
ferase, EC 2.4.1.1

Glucose-Oxidase oder β -D-Glucose: Sauerstoff-
Oxidoreduktase, EC 1.11.1.7

Lysozym oder Mucopепtid N-Acetylmuramylhydrolase,
EC 3.2.1.17

3. Einleitung

3.1. Enzyme und Substrate des α -Glucanabbaues

Seitdem man sich in der Biochemie mit Kohlehydraten befaßt, gilt dem Abbau und der Synthese von Stärke und Glykogen pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Ursprungs und den daran beteiligten Enzymen ein besonderes Interesse. Stärke und Glykogen sind Polylucosen, in denen Glucosemoleküle 1,4- α -glucosidisch zu linearen Molekülen verknüpft sind, die wiederum teilweise 1,6- α -glucosidisch verzweigt sind. Polylucosen, in denen die einzelnen Glucosemoleküle 1,4- α - und/oder 1,6- α -glucosidisch miteinander verbunden sind, nennt man α -Glucane. Eine wichtige Rolle spielen diese α -Glucane für den Energie und Reservestoffwechsel. Glucose, die von den meisten Organismen direkt in den Intermediärstoffwechsel eingespeist werden kann, entstammt größtenteils α -Glucanen wie Amylose, Stärke, Glykogen, Maltodextrinen, den Abbauprodukten der α -Glucane, und Maltose. Mikrobielle und pflanzliche Enzyme des Kohlehydratabbaues zeichnen sich durch eine besondere Variationsbreite bezüglich der Spezifität und des Zusammenwirkens aus. Enzyme, die in Bakterien für den Abbau von verzweigten und linearen α -Glucanen verantwortlich sein können, sind mit ihren Substraten und den Reaktionsprodukten ihrer Wirkungsweise auf diese Substrate in Abbildung 1 dargestellt.

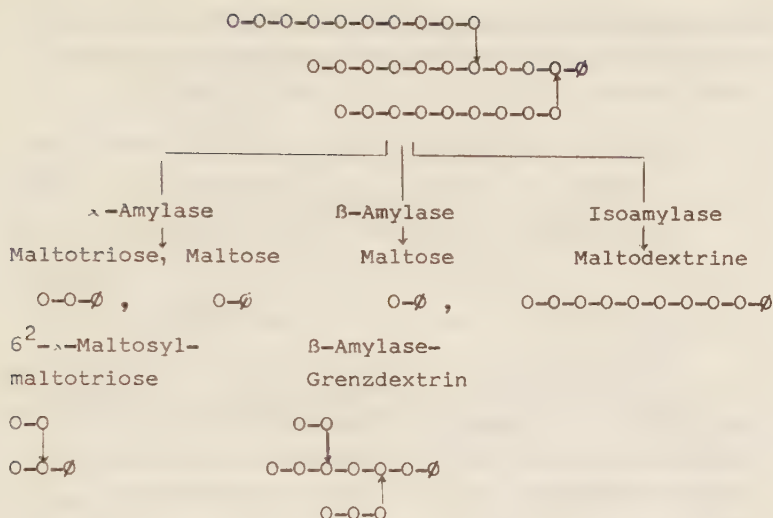


Abb. 1. a) Wirkungsweise von α -Amylase. α -Amylase ist eine 1,4- α -Endohydrolase, d.h., sie spaltet 1,4- α -glucosidische Bindungen im Inneren eines Moleküls. 1,6- α -glucosidische Bindungen werden nicht hydrolysiert, können aber umgangen werden.

β -Amylase. β -Amylase ist eine 1,4- α -Exohydrolase, die vom nichtreduzierenden Ende her aus einem α -Glucan Maltose abspaltet. Als Produkt der Hydrolyse jeder zweiten 1,4- α -glucosidischen Bindung erscheint β -Maltose. β -Amylase kann 1,6- α -glucosidische Bindungen weder spalten noch umgehen.

Wirkungsweise der Isoamylase. Ausschließlich 1,6- α -glucosidische Bindungen werden von diesem Enzym gespalten. Isoamylase kann keine 1,4- α -glucosidische Bindungen hydrolysieren.

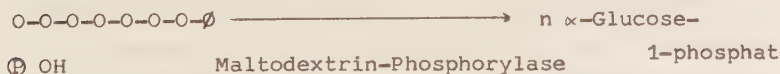


Abb. 1. b) Wirkungsweise von Maltodextrin-Phosphorylase.

Maltodextrin-Phosphorylase überträgt schrittweise vom nichtreduzierenden Ende her Glucosylreste auf anorganisches Phosphat. Es entsteht Glucose-1-phosphat.

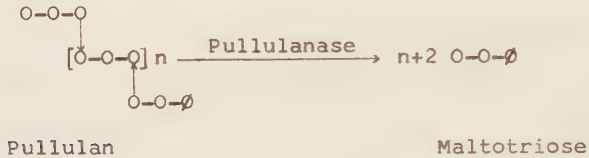


Abb. 1. c) Wirkungsweise von Pullulanase. Pullulanase hydrolisiert wie Isoamylase ausschließlich 1,6- α -glucosidische Bindungen, unterscheidet sich aber von Isoamylase dadurch, dass sie Pullulan hydrolisieren kann.

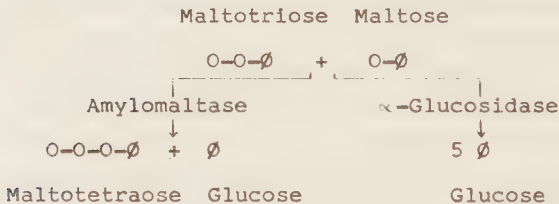


Abb. 1. d) Wirkungsweise von Amylomaltase. Amylomaltase katalysiert den Transfer einer Glucanosylgruppe, z.B. Maltose, auf ein Maltodextrin-Akzeptormolekül (Maltotriose).

α -Glucosidase. α -Glucosidase ist eine Exohydrolase, die vom nichtreduzierenden Ende her 1,4- α -glucosidische Bindungen in Glucosiden wie Maltotriose, Maltose und Saccharose hydrolisiert.

Zeichenerklärung zu den Abbildungen 1. a), b), c), d) :

O, Glucosylrest; $\emptyset$, reduzierendes Ende; O-O, 1,4- α -glucosidische Bindung; O $\rightarrow$ O, 1,6- α -glucosidische Bindung.

3.2. α -Glucanverwertung in gram-positiven und gram-negativen Bakterien (Maltose Operon)

Verschiedene Bakterien, z.B. Pseudomonas amyloclavata, P. saccharophila¹, P. stutzeri², Streptococcus mutans, Escherichia coli³ und Bacillus amyloliquefaciens⁴, zeigen ein ausgezeichnetes Wachstumsverhalten, wenn sie auf verschiedenen α -Glucanen, die als Kohlenstoffquelle im Medium vorgegeben werden, kultiviert werden. Die Enzyme, die mutmaßlich am Abbau linearer und verzweigter α -Glucane im Nährmedium beteiligt sind, wurden eingehend untersucht¹⁻⁴. Wegen der Ähnlichkeit des Stoffwechsels der α -Glucane in den verschiedenen Bakterien, sowohl gram-positive wie auch gram-negative, wurde ein Satz an Enzymen vorgeschlagen, der ein α -Glucanverwertungssystem bilden soll. Dieses Verwertungssystem kann in den Organismen, die dahingehend untersucht worden sind, die Enzyme α -Amylase, Pullulanase, Amylomaltase, Maltodextrin-Phosphorylase und Maltodextrin-Permease(n) umfassen^{3,5}. Die Enzyme dieses Stoffwechselsystems werden in den Organismen durch Vorgabe ihrer Substrate und deren Abbauprodukte im Nährmedium induziert. Ein Zusammenwirken der Enzyme ist in Abbildung 2 dargestellt. Ubiquitär vorkommende α -Glucane wie Stärke und Glykogen können durch das Zusammenwirken dieser Enzyme extrazellulär abgebaut und endogen zu Glucose und Glucose-1-phosphat weiterverwertet werden. Glucose und Glucose-1-phosphat können dann in die Glycolyse

oder den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg eingeschleust werden. B. amyloliquefaciens produziert extrazelluläre Isoamylase⁴ zusätzlich zu einer gut untersuchten α -Amylase⁶, wohingegen über die intrazellulären Enzyme des α -Glucanstoffwechsels wenig bekannt ist.

Extrazellulär

Intrazellulär

Verzweigtes 1,4- α -Glucan

Pullulanase und
 α -Amylase oder
Isoamylase oder
 α -Amylase oder
Pullulanase

Maltodextrine

Maltodextrin-
Permease(n)

Maltodextrine

Amylomaltase

Maltodextrin-
Phosphorylase

Glucose

α -D-Glucose-
1-phosphat

Glucose-6-phosphat

Intermediärstoffwechsel

Abb. 2. Schematische Darstellung des Stoffwechselweges für den Abbau verzweigter α -Glucane in Bakterien.

3.3. Sekretion extrazellulärer Enzyme und Polysaccharide

Glucose, die durch die Einwirkung der amylytischen Enzyme auf Polyglucosen im Nährmedium entsteht, wird vom Bakterium zu einem großen Teil in den Energiestoffwechsel eingespeist. Ein Teil der in die Zelle transportierten Glucose wird jedoch direkt oder chemisch modifiziert zur Synthese von Zellbausteinen, extrazellulären Schleimen, Kapseln oder löslichen Polysacchariden verwendet.

Sezernierte Polysaccharide sind wahrscheinlich auch bei der Sekretion extrazellulärer Proteine beteiligt. Bei der Untersuchung an Micrococcus sodonensis fanden Braatz und Heath^{7,8}, daß zusammen mit der von ihnen isolierten alkalischen Phosphatase ein Polysaccharid kosezerniert wurde. Die Polysaccharidsynthese in M. sodonensis ließ sich wirksam mit Desoxyglucose oder Glucosamin inhibieren, wobei gleichzeitig eine Hemmung der Phosphatasesekretion beobachtet wurde. 2-Desoxyglucose interferiert wahrscheinlich mit dem Glucosestoffwechsel und jenen Stoffwechselwegen, an denen UDP-Glucose beteiligt ist. Hierzu gehören die Synthesen von Polysacchariden in Glykoproteinen und Zellwandbestandteilen. Es wird vermutet, daß das Polysaccharid hauptsächlich zum Schutze vor dem Angriff von Proteasen auf ungefaltete Polypeptidstränge beim Austritt aus der Zellhülle dient. Bereits sezerniertes Enzym ist außer-

ordentlich stabil gegen den Angriff extrazellulärer Proteasen.

3.4. Reservekohlehydrate

In der späten exponentiellen Wachstumsphase und zu Beginn der frühen stationären Phase, wenn die Zellteilung auf Grund von Erschöpfung der Stickstoff-, Schwefel- oder Phosphorquelle bei einem Überschuß an Kohlenstoffquelle eingeschränkt wird, kann bei einer Reihe von Bakterien eine intrazelluläre Akkumulation von Polyglucosen beobachtet werden⁹. Die Fähigkeit zur Akkumulation von Glykogen-artigen Polyglucosen ist nicht auf eine bestimmte Klasse von Bakterien beschränkt.

Diese α -Glucane können dann unter Hungerbedingungen von den Organismen mobilisiert werden¹⁰. In grampositiven Bakterien wie Clostridium botulinum¹¹, C. pasteurianum¹² und B. cereus¹³ wird ein α -Glucan in der späten exponentiellen Wachstumsphase akkumuliert, das während der Sporenreifung als Kohlenstoff- und Energiequelle abgebaut werden kann. Eine Ausnahme in der Bildung von Glykogen stellt Rhodospseudomonas capsulata dar, da bei diesem Bakterium Akkumulation des Reservekohlehydrates während der optimalen Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Wachstumsphase stattfinden kann¹⁴. Von Goldemberg¹⁵ wurde die physiologische Rolle des von einer

Mutante von B. stearothermophilus gespeicherten Glykogens als Kohlenstoffquelle für die Resynthese von abgebauten Zellkomponenten diskutiert. In dem phototrophen Bakterium Anacystis nidulans dient Glykogen als Kohlenstoff- und Energiequelle in Zellen, die unter zeitlich begrenzten Hungerbedingungen gehalten wurden. Durch den Nachweis eines Turnovers von Glykogen in diesem Organismus konnte gezeigt werden, daß die Synthese und der Abbau von Glykogen sehr ausgewogen und daher strikt reguliert sein müssen¹⁶.

4. Ziele der Arbeit

4.1. Unter der Annahme, daß es ein allgemeingültiges Stoffwechselschema für die Verwertung von α -Glucanen bei Bakterien gibt, sollen die bisher gefundenen Ergebnisse^{3,5} an einem noch nicht untersuchten Stamm von E. coli(8729), reproduziert und mit den Befunden an B. amyloliquefaciens 23350 verglichen werden.

4.2. Die in B. amyloliquefaciens nachgewiesenen Enzyme sollen bezüglich ihrer subzellulären Verteilung untersucht und es soll ihnen auf Grund ihrer Lokalisation eine physiologische Funktion zugeschrieben werden.

4.3. Zusätzlich zu der Charakterisierung der Isoamylase⁴ ist die Untersuchung einer α -Glucosidase von besonderem Interesse.

4.4. Die Ergebnisse an B. amyloliquefaciens sollen gegebenenfalls zusammen mit den Ergebnissen, die bei der Untersuchung von B. subtilis 6633 und 6051 bezüglich der Enzyme der α -Glucanverwertung gefunden werden, in einen größeren Rahmen gestellt werden.

4.5. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Frage zu klären, ob ein oder mehrere spezifische Polysaccharide mit den extrazellulären Enzymen der α -Glucanverwertung kosezerniert werden.

4.6. Ein wichtiger Aspekt des endogenen α -Glucanstoffwechsels ist die Synthese intrazellulärer Poly-

glucose. Die Voraussetzungen für die Akkumulation von Glykogen in B. amyloliquefaciens und einige molekularen Eigenschaften dieses Glykogens werden untersucht. Weiterhin sollen Experimente beschrieben werden, die die physiologische Rolle von B. amyloliquefaciens Glykogen als Reservesubstanz, die Mobilisation und Turnover unterworfen ist, erhellen.

5. Material und Methoden

5.1. Chemikalien und Hilfsenzyme

Kohlehydrate, die als Kohlenstoffquelle und als Substrate in Enzymtests oder für analytische Zwecke benötigt und verwendet wurden, wurden von den folgenden Firmen bezogen: Amylose, lösliche Stärke, Maltose, Glucose, Galaktose, Mannose, Saccharose, myo-Inosit, p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid und p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid von Merck, Darmstadt, BRD; Pullulan, Fucose, Rhamnose, Xylose, Glucuronsäure und Glucosamin von Serva, Heidelberg, BRD; Galaktosamin und Galakturonsäure von Roth, Karlsruhe, BRD; 2-Desoxy-D-glucose von Riedel de Haën AG, Seelze-Hannover, BRD; Methyl- α -D-glucopyranosid, Isomaltose, Isomaltotriose und Austernglykogen, Typ II von Sigma, St. Louis, USA. Eine Maltodextrinmischung (durchschnittliche Kettenlänge 7 Glucose-Einheiten) wurde freundlicherweise von der Firma Corn Products International, USA, zur Verfügung gestellt. Phyto-
glykogen wurde aus Süßmais isoliert¹⁷. Maltotriose wurde durch Inkubation von Pullulan mit einer teilweise gereinigten Pullulanasepräparation aus Klebsiella pneumoniae erhalten. Nach Dialyse des Inkubationsansatzes mit einer Amicon Ultrafiltrationszelle (Membran UM-2) wurde Maltotriose im Diffusat gefunden. Gefriergetrocknetes Diffusat, das nur geringfügig mit Malto-

tetraose verunreinigt war, wurde als Substrat für Enzymtests eingesetzt. $[U-^{14}C]$ -Glucose wurde aus radioaktivem Anacystis nidulans Glykogen hergestellt¹⁸.

D-Glucose-Oxidase (grade III) und Peroxidase (grade II) waren Produkte der Fa. Boehringer Mannheim, BRD. Glucoamylase war ein teilweise gereinigtes¹⁹ technisches Präparat (Diazyme, Miles Laboratories, Elkhart, USA). β -Amylase wurde aus Süßkartoffeln gereinigt²⁰. Zur Entfernung von Verunreinigungen an α -Glucosidase wurde eine Methode nach Marshall und Whelan²¹ verwendet. Cytophaga Isoamylase wurde von British Drug House, Poole, Dorset, U.K. bezogen und nach Gunja-Smith et al. behandelt²². Serva, Heidelberg, BRD, lieferte Lysozym.

EDTA, Cetylpyridiniumchlorid, Triton X-100 (Polyoxyäthylen-p-t-octyl-phenol) und Natriumcholat wurden von Merck, Darmstadt, BRD, bezogen. Die zwitterionischen Detergentien Empigen BB (Alkyldimethylbetain) und Empigen BT (Alkylamidobetain) waren ein Geschenk der Fa. Marchon France S. A., Frankreich. Die nicht-ionischen Detergentien der Tween-Serie (Polyoxyäthylen-sorbitester), Tween 20 und Tween 85, sind Produkte der Fa. Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, U.K. SDS (Natrium Dodecylsulfat) wurde von Serva, Heidelberg, BRD, gekauft. Alle anderen Chemikalien waren von höchster Reinheit.

5.2. Mikroorganismen und Kulturbedingungen

Bacillus amyloliquefaciens ATCC 23350, Bacillus subtilis ATCC 6633 und 6051 wurden aerob bei 37 °C und Escherichia coli ATCC 8729 bei 32 °C in einem synthetischen Flüssigmedium der folgenden Zusammensetzung pro Liter kultiviert: Maltose oder eine andere Kohlenstoffquelle wie in den Ergebnissen angegeben, 10 g; NH_4Cl , 7 (5) g; Na_2SO_4 · 10 H_2O , 1 g; KH_2PO_4 , 3,24 g; K_2HPO_4 · 3 H_2O , 16,28 g; Natriumaspartat, 1 (0,5) g; Natriumglutaminat, 1 (0,5) g; 2 ml Spurenelemente nach Chen und Segel²³.

Die entsprechenden Konzentrationen der Mediumkomponenten für Sphäroplastenexperimente sind in Klammern angegeben. Mit Ausnahme von Zitronensäure und Äpfelsäure wurden Kohlenstoffquelle und Salzmedium getrennt sterilisiert und dann unter aseptischen Bedingungen zusammengegeben. Der pH des Mediums wurde vor der Sterilisation mit festem KH_2PO_4 auf pH 7,0 eingestellt.

5.3. Analytische Methoden

Die Aktivitäten von α -Amylase²⁴, Isoamylase⁴ und Pullulanase²⁵ wurden mit Amylose, löslicher Stärke und Pullulan als den entsprechenden Substraten bestimmt. Je nach Enzymquelle wurden pro Test 50 bis 200 μl Enzymlösung eingesetzt. Der Testansatz enthielt 0,1 ml einer 1 % (w/v) Substratlösung in 0,1 M Tris/ Maleat-Puffer, Enzymlösung und Puffer bis zu einem Endvolumen von 1 ml. Zur Bestimmung der α -Amylase und der Pullulanase wurde der

Puffer auf pH 6,0 und für Isoamylase auf pH 5,5 eingestellt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Enzymaktivität als Freisetzung reduzierender Endgruppen pro sec. bestimmt. Für die Messung wurde ein alkalisches Kupferreagenz nach einer Modifikation²⁶ der Methode nach Nelson²⁷ verwendet. Als Standard zur Aktivitätsbestimmung diente Glucosehydrat, während jedoch für die Freisetzung reduzierender Endgruppen aus lösl. Stärke und Pullulan durch Isoamylase oder Pullulanase Maltose verwendet wurde. Die Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode nimmt in der Reihe Glucose, Maltose, Maltotriose zu höheren Maltodextrinen hin ab.

α -Glucosidase wurde mit p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid als Substrat bestimmt. Der Standard Testansatz enthielt 0,3 ml einer 2 % igen (w/v) Substratlösung in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8), 50 bis 200 μ l Enzymlösung und den gleichen Puffer zur Ergänzung des Testansatzes auf 1 ml. Nach einer Inkubationszeit von maximal einer Stunde wurden 4 ml einer 0,1 M Na_2CO_3 -Lösung zugegeben. Enzymaktivität wird als gebildete Mole p-Nitrophenolat pro Sekunde ausgedrückt. Eine Eichkurve mit authentischem p-Nitrophenolat korrelierte die gemessene Absorption bei 400 nm mit der Konzentration.

Die Freisetzung von Glucose aus diversen α -Glucanen

wurde mit einem spezifischen Glucose-Oxidase-Reagenz bestimmt²⁸. Mittels Glucose-Oxidase wird Glucose zum Gluconolacton und weiter zu Gluconat oxidiert, dabei wird entstehendes H_2O_2 durch Peroxidase reduziert und ein Farbstoff, o-Dianisidin, oxidiert. Der entstandene Farbstoff absorbiert bei 540 nm. Die in der Probe enthaltene Glucose kann über eine Eichkurve mit der gemessenen Absorption korreliert werden.

Amylomaltase und Maltodextrin-Phosphorylase wurden durch die Freisetzung von $\underline{D}$ -Glucose aus Maltose²⁹, bzw. durch den Einbau von $\underline{D}$ - [^{14}C]-Glucose aus $\underline{D}$ -[U- ^{14}C]-Glucose-1-phosphat in Maltodextrine¹ bestimmt.

Der Testansatz für Amylomaltase enthielt 50 bis 200 μ l gepufferte Enzymlösung, 0,1 ml 1 % ige Maltoselösung und 0,1 M Acetatpuffer (pH 6,2). Endvolumen des Testansatzes war 1 ml. Die Maltoselösung, die als Substrat dient, bestand zu 95 % aus reiner Maltose und zu 5 % aus Maltose mit Kontaminationen an Maltodextrinen, die als Primer für die Enzymreaktion fungieren. Freigesetzte Glucose wurde mit dem spezifischen Glucose-Oxidase-Reagenz bestimmt.

Maltodextrin-Phosphorylase wird in der synthetischen

Richtung durch den Einbau von ^{14}C -markierter Glucose aus radioaktivem Glucose-1-phosphat in Maltodextrine bestimmt. Dazu wurden 50 bis 200 μl Enzymlösung 30 min bei 37°C mit 0,1 ml einer 1 % igen (w/v) Glucose-1-phosphat-Lösung, die $\underline{\text{D}}\text{-}[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-Glucose-1-phosphat}$ enthielt und mit 0,1 ml einer 5 % igen (w/v) Maltodextrinlösung inkubiert. Mit 0,1 M Acetatpuffer (pH 6,2) wurde das Volumen des Testansatzes auf 1 ml ergänzt. 0,5 ml des Testansatzes wurde auf einen Anionentauscher, Dowex 1 x 4, mesh 100-200, in der Formiatform (2 ml Säule, Pateur-Pipette) aufgetragen, der mit einer Maltodextrinlösung äquilibriert worden war. Nach dem Auftragen wurde mit 5 ml Wasser eluiert. 1 ml des Eluates wurde direkt durch Flüssigszintillation gezählt. Als Kontrolle wurde zur Bestimmung der Säulenkapazität auf eine Säule mit Anionentauscher, der gleich behandelt worden war, eine äquivalente Menge $\underline{\text{D}}\text{-}[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-Glucose-1-phosphat}$ aufgetragen.

5.3.2. Allgemeine Bestimmungsmethoden

Proteinbestimmungen zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten und zur Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen erfolgten nach einer Modifikation der Folin-Methode³⁰, wohingegen Elutionsprofile während der Säulenchromatographie durch Messung der Absorption der Proben bei 280/260 nm nach Layne³¹

durchgeführt wurden.

Adsorptionsspektren zur vergleichenden Bestimmung von Kettenlängen bei Polyglucosen und zum Nachweis der α -Amylase-Freiheit einer Enzympräparation können nach Krisman³² durch Jodanfärbung von α -Glucanen bei 400 bis 710 nm aufgenommen werden. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß α -Glucane mit Jod Komplexe bilden, deren Absorptionsmaximum abhängig von der Kettenlänge ist. Maltose und sehr niedermolekulare Maltodextrine bilden keine Jodkomplexe. Entsteht während der Inkubation eines α -Glucans mit einem amylytischen Enzym Maltose und Glucose, nimmt die Absorption des α -Glucan-Jod-Komplexes ab. Die gemessene Absorption kann mit der Konzentration über eine mit α -Glucan bekannter Konzentration aufgestellte Eichkurve korreliert werden.

Testansatz: 0,4 ml einer α -Glucanlösung (50 bis 750 μ g), 2,6 ml Jod/Jodid-Reagenz. Zusammensetzung des Jod/Jodid-Reagenzes: 130 ml einer bei Zimmertemperatur gesättigten CaCl_2 -Lösung in Wasser, 0,5 ml einer Lösung von 0,26 g J_2 und 2,6 g KJ in 10 ml Wasser. Der Testansatz wird 10 min bei 37 °C in ein Wasserbad gestellt und anschließend gegen einen Blindwert, der nur Jod/Jodid-Reagenz enthält, bei 710 nm gemessen. Als Standard diente eine Lösung von Amylose in Wasser (1 mg/ml), die mit Jod/Jodid-Reagenz inkubiert wurde.

Sowohl B. amyloliquefaciens wie auch B. subtilis neigen dazu, in der späten exponentiellen Wachstumsphase zu aggregieren und ein Pigment zu bilden. Aus diesen Gründen kann das Zellwachstum nicht durch einfache Trübungsmessungen des Kulturmediums gemessen werden. Das Wachstum der Zellen von Bacilli wurde daher durch eine modifizierte Proteinbestimmung und Trübungsmessung von Kulturproben, durch Bestimmung des Zelltrockengewichtes verfolgt³³.

Zur Bestimmung des Zelltrockengewichtes wurden jeweils 2 ml-Proben des Kulturmediums abzentrifugiert und anschließend mit Wasser auf 2 ml resuspendiert und bei 32 Khz je 1 min beschallt. Von dieser Suspension wurde 1 ml abgenommen, mit Wasser auf 2 ml verdünnt und mit 2 ml Trichloressigsäure (25 % w/v) versetzt. Nach genau 20 min wurde sorgfältig gemischt und die entstandene Trübung bei 600 nm gemessen. Zur Kalibrierung der Methode wurde parallel einmal das Zelltrockengewicht durch Wägung bestimmt. Das Zellwachstum von E. coli wurde durch einfache Trübungsmessung (1 ml Kulturmedium mit Wasser 1:5 verdünnt) bei 540 nm verfolgt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde routinemäßig mit 7,5 % igen zylindrischen Gelen zur Kontrolle der fortschreitenden Enzymreinigung durchgeführt. Zur Elektrophorese von nativem Protein diente ein anionisches System (pH 7,5) nach Williams und Reis-

feld³⁴, während Molekulargewichtsbestimmungen mit einem System nach Davis³⁵ durchgeführt wurden, das durch die Zugabe von 0,1 % Dodecylsulfat zum Trenngel, Stacking Gel, Elektrodenpuffer und zur Probe modifiziert wurde.

Gesamtkohlehydrat in Zellen und Medium wurde mit einem kombinierten Glucoamylase/Glucose-Oxidase-Reagenz nach Marshall und Whelan³⁶ bestimmt. Bei dieser Methode werden verzweigte und lineare α -Glucane durch Glucoamylase zu Glucose hydrolysiert, die dann durch Glucose-Oxidase und Peroxidase bestimmt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Kohlehydraten ist durch die Phenol-Schwefelsäure-Methode nach Dubois et al.³⁷ gegeben.

Zu 1 ml einer Kohlehydratlösung (10 bis 100 μ g) wird 50 μ l einer 80 %igen Phenollösung in Wasser zugesetzt. Es wird schnell 5 ml konz. H_2SO_4 zupipettiert und durchgemischt. 10 min stehen lassen, dann 10 min bei 37 °C in ein Wasserbad stellen. Die Extinktion von Neutral-Zuckern wird bei 490 nm gemessen. Als Standard dient Glucose. Das Prinzip der Methode beruht auf der Bildung eines gefärbten Komplexes zwischen Furfural bzw. Hydroxymethylfurfural und Phenol.

Gaschromatographische Analysen von Kohlehydraten wurden mit einem programmierbaren Gaschromatographen, Varian

aerograph, durchgeführt. Säule: 2 m, 1/8" ; Säulenmaterial: 3 % Silicon SE-30 auf Chromosorb G WA, 80 bis 100 mesh; Trägergas: N₂, 30 ml/h; Neutral-Zucker wie Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose und myo-Inosit, ebenso wie Hexosamine und Uronsäuren, wurden als TMS-Derivate separiert. (N-Trimethylsilyl-imidazol von Serva, Heidelberg, BRD). Normalerweise wurden 1-2 mg Zucker mit 200 µl Sililierungsmittel versetzt und zum Lösen leicht erhitzt. Anschließend konnten die Proben direkt analysiert werden, wobei eine Abhängigkeit der Derivatisierung der Zucker von der Zeitdauer der Erhitzung nicht festgestellt werden konnte. Das Temperaturprogramm für die Bestimmung von Uronsäuren und Neutral-Zuckern reichte von 160 bis 220 °C. Die Temperatur wurde nach Programmbeginn 25 min bei 160 °C gehalten. Anschließend wurde 5 min 4 °C pro min geheizt, 5 min isotherm gehalten und abschließend 5 min um 8 °C/min geheizt. Zur Bestimmung von Hexosaminen wurde isotherm bei 170 °C geheizt. Als interner Standard wurde bei den Bestimmungen myo-Inosit bzw. Rhamnose verwendet.

5.3.3. Isolierung von Glykogen

B. amyloliquefaciens wurde in einem stickstoffdefizienten Medium kultiviert, durch Zentrifugation in der frühen stationären Wachstumsphase geerntet, zweimal mit gekühltem 400 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) gewaschen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Zell-

trümmer wurden durch Zentrifugation mit einer Beckman J-21 B Zentrifuge (20 min bei 28 000 x g und 4 °C) aus dem Homogenat entfernt. Der klare Überstand wurde 15 min auf 100 °C erhitzt und erneut zentrifugiert. Nach Dialyse dieses Rohextraktes gegen 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5), wurde das nicht diffundierte Material zur Entfernung geladener Zucker und Proteine, über eine Säule mit DEAE-Cellulose (Pasteurpipette), die vorher mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war, gegeben. Gesamtkohlehydrat im Eluat wurde als Glucose mit dem Glucoamylase/Glucose-Oxidase-Reagenz³⁶, das gegen Austernglykogen kalibriert worden war, bestimmt. Die durchschnittliche Kettenlänge des Reservepolysaccharides ließ sich aus dem Verhältnis zwischen der Gesamtmenge an -Glucan in der Probe und der Freisetzung an reduzierenden Endgruppen nach Behandeln der Probe mit Isoamylase nach Gunja-Smith et al.²² herleiten. Eine weitere Methode zur Bestimmung der durchschnittlichen Kettenlänge der Polyglucose aus dem Gesamtgehalt an α -Glucan des Testansatzes und der Menge an Glucose, die aus ungeraden Ketten des α -Glucans durch Inkubation des Glykogens mit Isoamylase und nachfolgendem Abbau mit β -Amylase stammt, wurde ebenfalls angewendet. Die durchschnittliche Kettenlänge ($\bar{CL}$) ergab sich nach Lee und Whelan³⁸ wie folgt:

$$\bar{CL} = \text{Menge Polyglucose} / 2 \times \text{Menge Glucose}$$

Alle Testansätze mit β -Amylase (spezifische Aktivität $0,98 \times 10^{-8}$ kat/mg Protein) enthielten zur Stabilisierung des Enzymes 1 mg menschliches Serumalbumin und 1 mM Mercaptoäthanol. Störungen der Bestimmung reduzierender Endgruppen durch Mercaptoäthanol ließen sich durch Messung gegen entsprechende Blindinkubationen kompensieren.

5.3.4. Bestimmung von Radioaktivität in Glykogen

Zellen aus 100 ml Kultur wurden durch Zentrifugation (10 min bei 10 000 x g) geerntet, mit 400 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) gewaschen, in 5 ml 100 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) resuspendiert und beschallt. Nach Zentrifugation des Sonicates, wurden 0,5 ml des klaren Überstandes zur Bestimmung des α -Glucangehaltes mit Glucoamylase/Glucose-Oxidase-Reagenz eingesetzt. Um Proteine und geladene Zucker aus der Rohpräparation zu entfernen, wurden 2 ml des Homogenates über eine Säule (Pasteurpipette), die mit je 1 ml Anionentauscher, Dowex 1x4, 100-200 mesh, und Kationentauscher, Dowex 50 WX 2, 50-100 mesh, gefüllt und mit einer Glykogenlösung (10 mg/ml) in Wasser vorgewaschen worden war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 2 ml Wasser eluiert. 0,5 ml des Eluates wurde direkt durch Flüssigkeitszintillation in einem Packard Tri-Carb Scintillation Spectrometer, model 544, ausgezählt. Je 1 ml des Eluates wurde auf ein Stück Chromatographie-

papier (1 x 1 cm, Schleicher und Schüll, No. 2043 b) aufgebracht, in einer 60 % igen Methanolllösung gewaschen und mit Luft getrocknet. Ein Stück Papier wurde mit Glucoamylase ($1,06 \times 10^{-6}$ kat/mg) in 10 ml 50 mM Tris/Maleat-Puffer (pH 5,5) besprüht, 30 min in einer Feuchtkammer inkubiert, luftgetrocknet und in 60 % Methanol getaucht. Nach Trocknen und Auszählen beider Stückchen Papier ließ sich die Menge an radioaktivem Glykogen in der Probe aus der Differenz zwischen der Glucoamylase-behandelten und der unbehandelten Probe bestimmen, da polymere Kohlehydrate mit Methanol dieser Konzentration präzipitiert werden.

6. Ergebnisse

6.1.1. Enzyme der α -Glucanverwertung in E. coli

Da E. coli 8729 ebenso wie andere E. coli-Stämme ein ausgezeichnetes Wachstum auf α -Glucanen zeigt, wurde vorausgesetzt, daß dieses Isolat auch über die entsprechenden Enzyme des extrazellulären und intrazellulären α -Glucanabbaues verfügt. Für die Anzucht des Bakteriums wurde Maltose als Kohlenstoffquelle genommen, da man von diesem Kohlehydrat in Analogie zu den anderen Bakterien, in denen das α -Glucanverwertungssystem realisiert ist, annehmen kann, daß es die Enzyme des α -Glucanabbaues induziert.

Durch Tests von Zellhomogenaten und Kulturmedium auf 1,4- α -Glucanasen mit Amylose und auf 1,6- α -Glucanasen mit löslicher Stärke und Pullulan konnten im Nährmedium des Bakteriums α -Amylase und Pullulanase nachgewiesen werden. 20 % der Aktivität beider Enzyme wurde auch zellgebunden gefunden, was auf Adsorptionseffekte an der äußeren Membrane zurückgeführt werden kann, da sich diese Enzymaktivitäten leicht mit einer 1 M NaCl-Lösung in Arbeitspuffer von den Zellen ablösen ließen. Da sowohl Enzymaktivität mit löslicher Stärke wie auch mit Pullulan beobachtet wurde, ist zweifelsfrei anzunehmen, daß die Enzymaktivität, die wesentlich größer mit lösl. Stärke als mit Amylose war, einer Pullulanase zugerechnet werden kann. Beide Enzyme,

α -Amylase und Pullulanase akkumulierten am Ende der exponentiellen Wachstumsphase im Nährmedium. An extrazellulären Enzymen des α -Glucanverwertungssystems konnten Amylomaltase und Maltodextrin-Phosphorylase gefunden werden. Das Maximum der Amylomaltaseaktivität lag im ersten Drittel der exponentiellen Wachstumsphase, wohingegen das Maximum der Maltodextrin-Phosphorylase im letzten Drittel gefunden wurde. Über 70 % der maximal gemessenen Aktivität dieses Enzymes werden noch in der späten stationären Phase festgestellt, was mutmaßlich auf eine Überschneidung der Maltodextrin-Phosphorylaseaktivität mit einer Glykogen-Phosphorylaseaktivität hindeutet. Die Deutung dieses Phänomens ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Eine α -Glucosidase- oder Maltaseaktivität war zu keinem Zeitpunkt des Wachstums durch Inkubation von Zellhomogenaten mit Saccharose oder p-Nitrophenylglucosid nachzuweisen.

6.1.2. Enzyme der α -Glucanverwertung in B. amyloliquefaciens 23350 und B. subtilis 6051 und 6633

Beide Bacillusarten sind wegen ihrer hohen Produktivität an extrazellulären α -Amylasen bekannt^{6,39}. Zusätzlich zu dieser gut untersuchten α -Amylase wurde in B. amyloliquefaciens eine extrazelluläre Isoamylase gefunden⁴. Im Nährmedium beider B. subtilis-

Stämme konnte keine 1,6- α -Glucanase nachgewiesen werden. In den drei untersuchten Bacillusarten ließen sich weder extrazellulär noch intrazellulär weitere Komponenten des α -Glucanverwertungssystems nachweisen, jedoch wurde sowohl in B. amyloliquefaciens wie auch in B. subtilis eine zellgebundene α -Glucosidase gefunden. Die aus Zellhomogenaten gewonnenen Rohextrakte zeigten mit p-Nitrophenylglucosid eine höhere gemessene Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion als mit Maltose. Darüber hinaus zeigte die α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens eine deutliche Präferenz für Saccharose, mit der in diesem Organismus die höchsten Anfangsgeschwindigkeiten festgestellt wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an E. coli, B. amyloliquefaciens und B. subtilis bezüglich der Ausstattung mit den Enzymen des α -Glucanverwertungssystems sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1

	<u>B. subtilis</u> 6051 6633		<u>B. amylo.</u> 23350	<u>E. coli</u> 8729
α -Amylase	+,1	+,1	+,1,2	+,1
Isoamylase	-	-	+,1	-
Pullulanase	-	-	-	+,1
Amylomaltase	-	-	-	+,2
Maltodextrin- Phosphorylase	-	-	-	+,2
α -Glucosidase	+,2	+,2	+,2	-

Zeichenerklärung zu Tab. 1 : +, nachweisbar; -, nicht nachweisbar; 1, extrazellulär; 2, intrazellulär.

Erläuterung zu Tab. 1 :

B. subtilis und B. amyloliquefaciens wurden in dem unter Material und Methoden beschriebenen Medium (pH 7,0) und E. coli in dem gleichen Medium (pH 6,8) mit Maltose als alleinige Kohlenstoffquelle aerob bei 37 °C (Bacilli) bzw. 32 °C (E. coli) in einem New-Brunswick-Schüttler in konischen Erlemeyerflaschen in 500 ml Kulturen kultiviert. In verschiedenen Zeitabständen wurden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von α -Amylase, Isoamylase, Pullulanase, Amylomaltase, Maltodextrin-Phosphorylase und α -Glucosidase 10 ml-Proben aseptisch der Kultur entnommen, auf ca. 4 °C gekühlt und zentrifugiert (20 000 x g, 15 min). Abzentrifugierte Zellen wurden zweimal gewaschen und auf 10 ml mit 0,1 M Tris/Maleat-Puffer (pH 6,2) resuspendiert und anschließend beschallt (Branson-Sonifier J-1, 32 Khz, 1,5 min), wobei die Temperatur der Probe auf 4 °C gehalten wurde. Es wurde erneut zentrifugiert (Sorvall RC 2-B, 48 000 x g, 30 min). Der klare Überstand wurde für individuelle Enzymtests eingesetzt. Für Phosphorylasetests wurde der pH auf 6,5 eingestellt. Dieser Testansatz enthielt 1 mM EDTA und 0,5 mM Dithiothreitol. Die Bestimmung extrazellulärer Enzymaktivitäten wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation (zur Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium) durchgeführt. Der Überstand wurde gegen das dreifache Volumen an Arbeitspuffer (pH 6,2) dialysiert und auf ein Volumen von 10 ml ankonzentriert (Amicon Ultrafiltrationzelle, PM 10 Diaflo Membrane). Sowohl für Aktivitätstests auf extrazelluläre wie auf intrazelluläre Enzyme wurden normalerweise 0,1 ml Rohextrakt und 0,1 ml Substratlösung (1 % ig) eingesetzt. Nach Auffüllen mit Arbeitspuffer hatte der Testansatz ein Endvolumen von 1 ml.

6.1.3. Physiologie der α -Glucosidasebildung in B. amyloliquefaciens

Wie die Ergebnisse der Untersuchung der Enzyme des α -Glucanstoffwechsels von E. coli und B. amyloliquefaciens zeigten, gibt es augenscheinlich Unterschiede in der Ausstattung der Organismen mit α -Glucan abbauenden Enzymen. Unter der Voraussetzung, daß in einigen Bakterien die intrazellulären Komponenten des α -Glucanverwertungssystems, Amylolmaltase und Maltodextrin-Phosphorylase, durch α -Glucosidase ersetzt sind, sollte eine Beteiligung dieses Enzymes an der Verwertung extrazellulärer Polyglucosen, die als Kohlenstoffquelle dienen, durch Wachstumsexperimente mit verschiedenen Kohlenstoffquellen nachgewiesen werden können. Konsequenterweise wurden Zellen von B. amyloliquefaciens auf Polysacchariden, die als Induktoren der Enzyme des α -Glucanverwertungssystems bekannt sind, oder auf Kohlenstoffquellen mit mutmaßlich keinem oder geringem induzierenden Effekt kultiviert. Von verschiedenen Experimenten seien hier die Ergebnisse, die mit löslicher Stärke, Maltose, Maltodextrinen, Glucose und Acetat bezüglich der Zellausbeuten erhalten werden, dargestellt. Ungeachtet des Polymerizationsgrades oder der Anwesenheit oder Abwesenheit von 1,6- α -glucosidischen Bindungen in dem als Kohlenstoffquelle dienenden α -Glucan war die Zellteilungsrate im wesentlichen die gleiche (siehe Abb. 3 a). Analoge Wachstumsmuster erhielt man auch mit Glykogen und Amylopektin

(Ergebnisse nicht dokumentiert). Die Zellausbeuten mit Polysacchariden waren deutlich größer als die, die mit Acetat erzielt wurden.

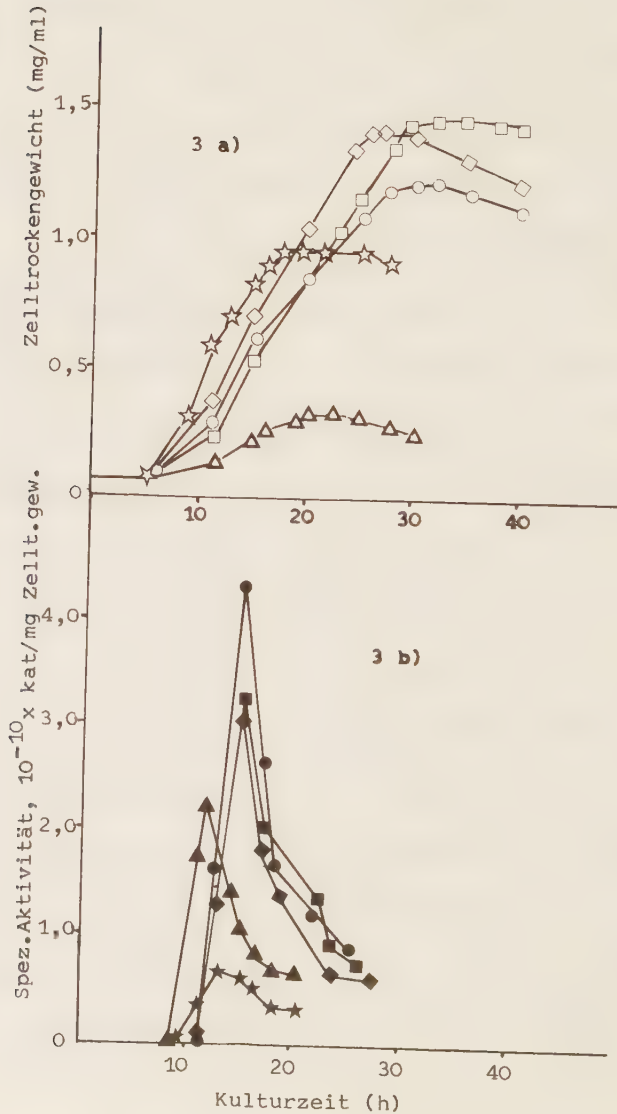


Abb. 3. Wachstum von B. amyloliquefaciens auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (a) und zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität von α -Glucosidase während des Wachstums des Bakteriums (b).

Für Wachstumsexperimente wurden Zellen, die auf Agarplatten bebrütet worden waren, in 125 ml Medium (pH 7,0) inoculiert, das Maltose als die alleinige Kohlenstoffquelle enthielt. Bei einer Zelldichte von 0,8 mg/ml Zelltrockengewicht wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit frischem Salzmedium ohne Maltose gewaschen und mit dem gleichen Medium auf die ursprüngliche Zelldichte resuspendiert. Jeweils 10 ml dieser Suspension wurden in 500 ml Medium inoculiert, bevor die entsprechenden Kohlehydrate in wässriger Lösung unter aseptischen Bedingungen zugegeben wurden. (Offene Symbole, Wachstum; geschlossene Symbole, spezifische Aktivität von α -Glucosidase), $\diamond$, lösliche Stärke; $\circ$, Maltodextrine; $\square$, Maltose; $\star$, Glucose; Δ , Natriumacetat.

Das beobachtete Wachstumsverhalten fiel mit den in den Zellen bestimmbaren Mengen an α -Glucosidase zusammen. Wachstumssubstrate, die einen weiteren Abbau benötigen, bevor sie in den Intermediärstoffwechsel einmünden können, erzeugten eine größere Menge an α -Glucosidase in den Zellen als solche Substrate, wie Glucose und Acetat, die direkt in den Stoffwechsel eingeschleust werden können (Abb. 3 b). Obwohl die spezifischen Aktivitäten von α -Glucosidase in Zellen, die auf Acetat gewachsen waren, höher waren, als die von Zellen, die auf Glucose kultiviert worden waren, waren die absoluten Mengen an α -Glucosidase in den Zellen beider Kulturen annähernd gleich.

Diese Ergebnisse konnten durch Kontrollexperimente untermauert werden, in denen (i) eine Kohlenstoffquelle aus dem Medium fortgelassen wurde, und in denen (ii) Polysaccharide als Kohlenstoffquelle im Medium durch Saccharose, Äpfelsäure und Citronensäure als die entsprechenden Wachstumssubstrate ersetzt wurden (Abb. 4 a). Mit Ausnahme der auf Saccharose gewachsenen Zellen waren die Zellausbeuten, die beobachtet wurden, in der gleichen Größenordnung wie die von Zellen, die auf Acetat gewachsen waren. In diesem Experiment ließ sich ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der α -Glucosidaseaktivität während des Wachstums mit den Nicht-Kohlehydraten beobachten (Abb. 4 b). Die höhere spezifische Aktivität des Enzymes in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, die gemessen wurde, wenn die Bakterien auf Saccharose wuchsen, läßt sich nicht nur mit der deutlichgeringeren Zellausbeute erklären, sondern hat ihre Ursache in einem zehnfachen Anstieg der Absolutaktivität des Enzymes im Vergleich mit Zellen, die auf α -Glucanen gewachsen waren.

Die folgenden Rückschlüsse können aus diesen Beobachtungen gezogen werden : (i) Wächst B. amyloliquefaciens auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, wird die Synthese von α -Glucosidase unterschiedlich stark induziert; (ii) das Enzym wird teilweise induziert, wenn der Organismus auf α -Glucanen wächst und wird stark induziert bei Wachstum auf α -Glucosiden wie Saccharose;

- (iii) die Mengen an Enzym, die bei Wachstum auf Nicht-Kohlehydraten bestimmt werden können, korrespondieren mit dem konstitutiven Spiegel an Enzym im Bakterium;
- (iv) Katabolitrepression des Enzymes wird festgestellt, wenn der Organismus auf einem Medium wächst, in dem sich größere Mengen an Glucose befinden.

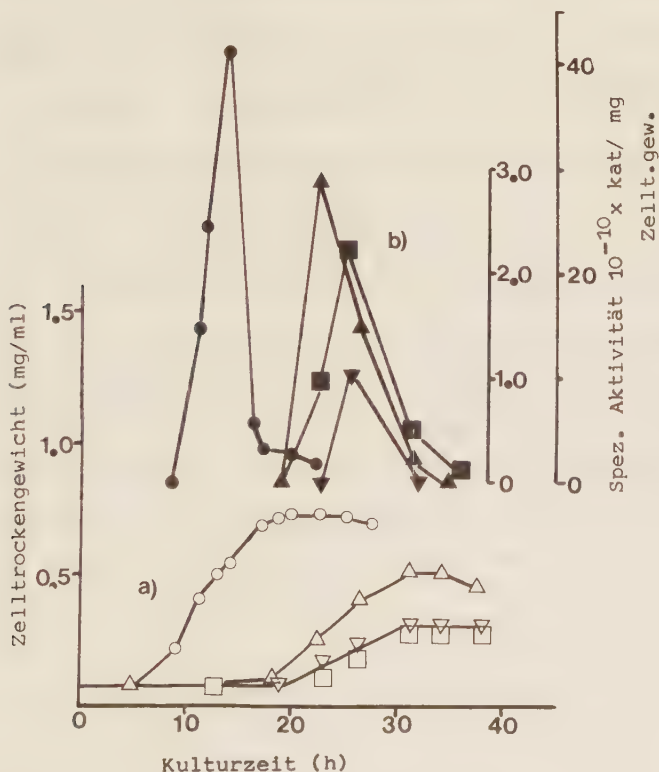


Abb. 4. Wachstum von B. amyloliquefaciens auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (a) und zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität von α -Glucosidase (b) während des Wachstums. Die experimentellen Bedingungen für die Kultur der Bakterien und die Bestimmung der Enzymaktivität waren die gleichen wie in der Legende zu Abb. 4 ausgeführt.

(Offene Symbole, Wachstum; geschlossene Symbole, spezifische Aktivität), $\circ$, Saccharose; $\square$, Äpfelsäure; $\triangle$, Citronensäure; ∇ , Kontrolle ohne C-Quelle.

6.1.4. Subzelluläre Lokalisation von α -Glucosidase

Die Frage nach der subzellulären Verteilung von B. amyloliquefaciens α -Glucosidase ist von besonderem Interesse, falls dieses Enzym tatsächlich die in anderen Organismen gefundenen intrazellulären Komponenten des α -Glucanverwertungssystems ersetzt. Auf Grund der Ergebnisse der nachfolgend beschriebenen Experimente kann α -Glucosidase als ein zellgebundenes Enzym angesehen werden. Das Enzym wurde ausschließlich in Zellhomogenaten bestimmt, da im Kulturmedium eine Aktivität dieses Enzymes zu keinem Zeitpunkt des Wachstums feststellbar war. Genaue Informationen über die subzelluläre Verteilung der Enzyme, die mutmaßlich am α -Glucanstoffwechsel in diesem Bakterium beteiligt sind, können durch die Präparation von Sphäroplasten erhalten werden (vgl. Abb. 5).

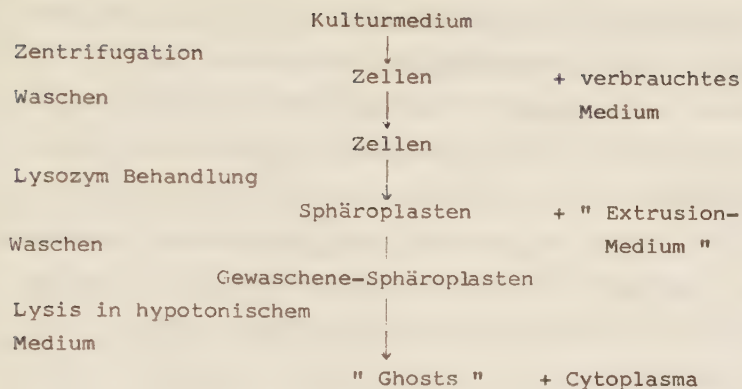


Abb. 5. Flußschema für die Präparation von Sphäroplasten aus Zellen von B. amyloliquefaciens.

Zellen aus 500 ml Kultur wurden in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet (28 000 x g, 40 min), zweimal mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) gewaschen, zentrifugiert und in 16 ml 0,4 M Natriummaleatpuffer (pH 6,0) resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym zu der Suspension (Endkonzentration 50 µg/ml) wurde 2 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Umwandlung der Zellen in Sphäroplasten, die mit einem Phasenkontrastmikroskop verfolgt wurde, war nach dieser Zeit beendet. Die Sphäroplasten wurden von dem " Extrusion-Medium " durch Zentrifugation (7 000 x g, 20 min) abgetrennt und nach Resuspension in 0,4 M Maleatpuffer (pH 6,0) erneut zentrifugiert. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit dem " Extrusion-Medium " vereinigt. Durch Suspendieren in 10 mM Natriummaleatpuffer (pH 6,0) wurden die Sphäroplasten lysiert. Die lysierten Sphäroplasten wurden erneut zentrifugiert (28 000 x g, 40 min), um das Cytoplasma von Membranpartikeln zu trennen. Der Niederschlag der hauptsächlich aus Membranpartikeln besteht ("Ghosts"), der Überstand (Cytoplasma) und "Extrusion-Medium " wurden für Enzymtests eingesetzt.

Die Ergebnisse der Enzymtests mit den subzellulären Komponenten, die als Enzymquelle dienten, sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Wie schon bei Tests mit Rohextrakten festgestellt, ließen sich weder Amylomaltase noch Maltodextrin-Phosphorylase in dem Organismus nachweisen, wohl aber konnte eine α -Glucosidase bestimmt werden, die stets mit Membranfragmenten assoziiert war. Darüber hinaus wurde eine amyolytische Aktivität im Cytoplasma gefunden, die vorläufig einer α -Amylase zugeordnet werden muß.

Tabelle 2

Subzelluläre Verteilung der Enzyme des α -Glucanabbaues in B. amyloliquefaciens

	α -Amylase	Isoamylase	α -Glucosidase
Kulturmedium	+	+	-
"Extrusion-Medium"	+	+	-
"Ghosts"	-	-	+
Cytoplasma	+	-	-

Zur Bestätigung, daß α -Glucosidase in B. amyloliquefaciens eine membrangebundenes Protein ist, wurden die relativen Enzymaktivitäten, die in Sedimenten und Überständen nach differentieller Zentrifugation gefunden wurden, bestimmt. Dazu wurden Zellen aus 100 ml Kultur in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 10 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Nach 1,5 min Beschallen bei 40°C und 35 KHz,

wurde das Homogenat bei 28 000xg für 20 min zentrifugiert (1. Schritt). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit einer Ultrazentrifuge bei 104 000xg für 60 min zentrifugiert (2. Schritt). Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde nochmals bei 104 000xg für 240 min zentrifugiert (3. Schritt). Die Niederschläge wurden jeweils mit dem Arbeitspuffer auf 10 ml resuspendiert. Die Ergebnisse der Enzymbestimmungen nach differentieller Zentrifugation gaben einen weiteren Hinweis darauf, daß α -Glucosidase eine partikuläres Enzym ist (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3

Verteilung der relativen Enzymaktivitäten von α -Glucosidase nach differentieller Zentrifugation (Aktivität im Zellhomogenat gleich 100 % gesetzt).

Zentrifugation bei (x g)	min	Relative Aktivität in %	
		Niederschlag	Überstand
1. 28 000	20	73,0	27,0
2. 104 000	60	8,6	18,4
3. 104 000	240	14,2	4,2
Ausbeute :		95,8	4,2

Die mit B. amyloliquefaciens gefundenen Ergebnisse bezüglich der Verteilung der mutmaßlich am α -Glucanabbau beteiligten Enzyme ließen sich - mit Ausnahme einer extrazellulären Isoamylase - mit B. subtilis 6633 reproduzieren. In analoger Weise, wie bei B. amyloliquefaciens, wurden aus Zellen von B. subtilis 6633, die

sich in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase in einem Medium (pH 7,0) mit Maltose als alleinige Kohlenstoffquelle befanden, Sphäroplasten erzeugt. Die Ergebnisse der Enzymtests nach Separierung der subzellulären Komponenten sind nach Auslassung der Isoamylase identisch mit den in Tabelle 2 für B. amyloliquefaciens aufgeführten Resultaten. In B. subtilis 6633 und B. subtilis 6051 waren ebenso wie in B. amyloliquefaciens nach Herstellung von Sphäroplasten (bei B. subtilis 6051 wurde allerdings nur mit Zellhomogenaten aus gewaschenen Zellen getestet) keine intrazelluläre Amylomaltase und Maltodextrin-Phosphorylase nachweisbar.

Auch die Verteilung der relativen Aktivitäten von α -Glucosidase waren nach Homogenisieren von Zellen und anschließender Zentrifugation der Homogenate ähnlich wie in B. amyloliquefaciens. Nach 28 000 x g Zentrifugation (20 min) wurden in den Sedimenten für B. subtilis 6051 65 %, für B. subtilis 6633 54 % der relativen Gesamtaktivität gefunden. Durch Ultrazentrifugation der Überstände (104 000 x g, 240 min) konnten die Totalausbeuten in den Niederschlägen für B. subtilis 6051 auf 86 % und für B. subtilis 6633 auf 82 % gesteigert werden.

6.1.5. Solubilisierung der membrangebundenen α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens

Durch Präparation von Sphäroplasten aus Zellen von B.

amyloliquefaciens und differentieller Zentrifugation von Zellhomogenaten konnte festgestellt werden, daß α -Glucosidase ein membrangebundenes Protein ist. Diese Experimente gaben jedoch keinen Hinweis auf die Natur der Bindung des Enzymes an die Membran. Die Frage, ob α -Glucosidase in diesem Bakterium ein peripheres oder ein integriertes Membran-Protein ist, sollte im weiteren Verlauf der Untersuchung durch Behandeln der Membranen mit Salzlösungen, komplexierenden Agentien, anionischen, ampholytischen, kationischen und nicht-ionischen Detergentien geklärt werden. Obwohl außer α -Glucosidase keine weiteren amylolytischen Aktivitäten membrangebunden feststellbar waren, war die Kenntnis der Wechselwirkung des Proteins mit der Membran Voraussetzung für eine weitere Reinigung und Charakterisierung des Enzymes.

Zur selektiven Solubilisierung von α -Glucosidase aus Membranen von B. amyloliquefaciens wurden die Zellen aus einer 0,75 l Kultur durch Zentrifugation in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase (0,9 mg/ml Zelltrockengewicht) geerntet. Der Niederschlag der Zentrifugation wurde zweimal mit 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) gewaschen und mit dem gleichen Puffer auf ein Endvolumen von 70 ml resuspendiert. Nach Beschallen (1,5 min, 30 Khz, 4 °C), wurden Zellfragmente aus dem Homogenat durch Zentrifugation (48 000 x g, 60 min) entfernt. Der Niederschlag wurde in 70

ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) aufgenommen, mit einem Braun-Glaspotter homogenisiert und in 4 ml-Fraktionen geteilt. Zu jeder Fraktion wurde 0,1 ml des entsprechenden Detergenzes in gepufferter Lösung (gleicher Puffer wie Arbeitspuffer) zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und leichtem Schütteln wurden nicht solubilisierbare Membranfragmente abzentrifugiert (28 000 x g, 60 min). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde für Enzymtests eingesetzt.

Die Resultate der Behandlung von B. amyloliquefaciens Membranen mit Detergentien sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die höchste Solubilisierungsrate wurde mit Natriumcholat in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) in Gegenwart von 0,4 M Natriumchlorid beobachtet. Wenn in Kontrollexperimenten das Detergens fortgelassen wurde, zeigte sich, daß Lösungen mit hoher Ionenstärke alleine nicht in der Lage waren, signifikante Mengen an α -Glucosidase von den Membranen abzulösen. Obwohl Konzentrationen an Detergen, die über die in Tab. 4 angegebenen Konzentrationen hinausgingen, größere Mengen an Protein solubilisierten, nahm die α -Glucosidaseaktivität drastisch ab. Ein Aliquot der mit Natriumcholat solubilisierten Proteinelösung wurde erschöpfend in einer Amiconzelle (PM 10 Diaflo Membrane) gegen 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) dialysiert. Nach der Dialyse war die Proteinelösung merklich getrübt und die Enzymaktivität vollständig verloren gegangen. α -Glucosidaseaktivität konnte nach Dialyse durch Zugabe von Detergenz und Einstellen des pH's auf 8,0

nicht reaktiviert werden. Wurde die mit Natriumcholat (1 mg/ml) solubilisierete α -Glucosidase 24 h bei 11 °C aufgehoben, so trat ein Verlust von 80 % Aktivität ein.

Um die Stabilität der solubilisierten α -Glucosidase zu erhöhen, wurden Versuche gemacht, Natriumcholat sofort nach Solubilisieren des Enzymes durch ein nichtionisches Detergens zu ersetzen. Aliquots des Proteins (Endkonzentration 0,46 mg/ml) in einer Lösung von 2 mg/ml Natriumcholat in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) und 0,4 M Natriumchlorid wurden gegen 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8), der verschiedene Konzentrationen der nichtionischen Detergentien Tween 20, Triton X-100 und Tween 85 enthielt, dialysiert. Mit abnehmender HLB-Nummer (hydrophile-lipophile Balance) des Detergens nahm die Ausbeute an α -Glucosidaseaktivität in diesem Experiment zu. In einer Serie von Versuchen zur Bestimmung der Effizienz der Substitution von Natriumcholat durch Detergentien verschiedener Konzentrationen wurden folgende optimalen Werte erhalten (bezogen auf Aktivität der α -Glucosidase nach Solubilisierung mit Natriumcholat = 100 %) :

Tween 20 (2 mg/ml), 20 % ; Triton X-100 (5 mg/ml), 33 % ; Tween 85 (2 mg/ml), 37 %.

Tabelle 4. Differentielle Solubilisierung von α -Glucosidase aus Membranen von B. amyloliquefaciens mit verschiedenen Detergentien. 100 % Aktivität entspricht $48,58 \times 10^{-10}$ kat/ml Zellhomogenat mit einer spezifischen Aktivität von $9,72 \times 10^{-10}$ kat/mg Protein.

Detergentien	Konz. %	10^{-10} kat	% Solub. Enzym-aktivität	Solub. Protein mg/ml	Spez. Aktivität $\times 10^{-10}$ kat/mg Protein
0,4 M NaCl in 50 mM Natrium-phosphatpuffer (pH 6,8)	-	2,42	4,92	0,333	6,67
EDCA	0,1	2,73	5,03	0,355	8,25
EDTA	0,2	2,61	5,37	0,336	7,74
Anionisch	Na-Cholat (pH 6,8)	0,1	3,00	0,271	11,37
	Na-Cholat (pH 6,8)	0,2	3,38	0,392	8,62
	Na-Cholat (pH 6,0)	0,1	15,65	0,319	62,23
	0,4 M NaCl				
Zwitter-ionisch	SDS	0,01	2,40	0,262	9,16
	SDS	0,02	3,20	0,311	14,91
	Empigen BT	0,1	7,55	0,402	17,09
	Empigen BT	0,2	4,62	0,506	9,13
Nicht-ionisch	Empigen BB	0,1	5,09	0,472	19,23
	Empigen DB	0,2	2,93	0,403	8,26
	Tween 20	0,1	2,40	0,365	6,58
	Tween 20	0,2	4,00	0,301	13,29
Kationisch	Tween 35	0,1	11,25	0,417	27,00
	Tween 85	0,2	7,75	0,505	15,35
	Cetylpyridiniumchlorid	0,05	2,37	0,28	22,41
	Cetylpyridiniumchlorid	0,1	1,53	0,307	5,33

6.1.6. Reinigung der α -Glucosidase

Zur weiteren Charakterisierung wurde die α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens gereinigt. Zellen aus 3 l Kultur wurden in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase (0,8 mg/ml Zelltrockengewicht) durch Zentrifugation geerntet (10 000 x g, 60 min). Der Niederschlag wurde zweimal mit auf 4 °C vorgekühltem 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) gewaschen, nochmals zentrifugiert und mit 20 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension 1,5 min bei 4 °C und 32 Khz beschallt und abzentrifugiert (20 000 x g, 60 min). Nach Fällung der Nucleinsäuren mit 2 % (w/v) Streptomycinsulfat (Endkonzentration) aus dem Überstand wurde nochmals zentrifugiert und der resultierende Überstand gegen 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) in einer Amiconzelle (XM 50 Membran) dialysiert. Diese Rohpräparation, die partikuläre α -Glucosidase enthielt, wurde auf ein Molekularsieb, Ultrogel AcA 44, aufgetragen und mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) eluiert (Abbildung 6).

α -Glucosidase-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt.

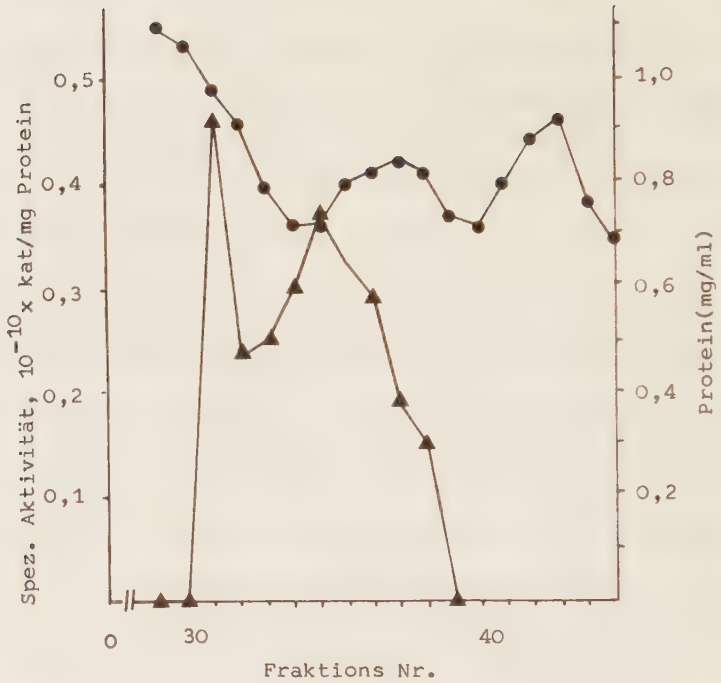


Abb. 6. Elutionsprofil der partikulären α -Glucosidase von einem Molekularsieb, Ultrogel AcA 44, (Säule 120,0 x 2,0 cm), das mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) äquilibriert war. Die einzelnen Fraktionen hatten ein Volumen von 4 ml. ●, Protein; ▲, spezifische Aktivität der α -Glucosidase.

Nach anschließender Adsorption an einen DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher konnte α -Glucosidase mit einem kontinuierlichen Salzgradienten steigender Ionenstärke von dem Austauscherharz eluiert werden (Abb. 7).

Proben der vereinigten Fraktionen, die vesikuläre α -Glucosidase enthielten, verloren nach Dialyse gegen den Elutionspuffer (um Natriumchlorid zu entfernen) lediglich 12 % an Aktivität, wenn sie 6 Tage bei 4 °C aufgehoben wurden. Nach wiederholtem Frieren und Auftauen konnte kein Aktivitätsverlust der Präparation festgestellt werden.

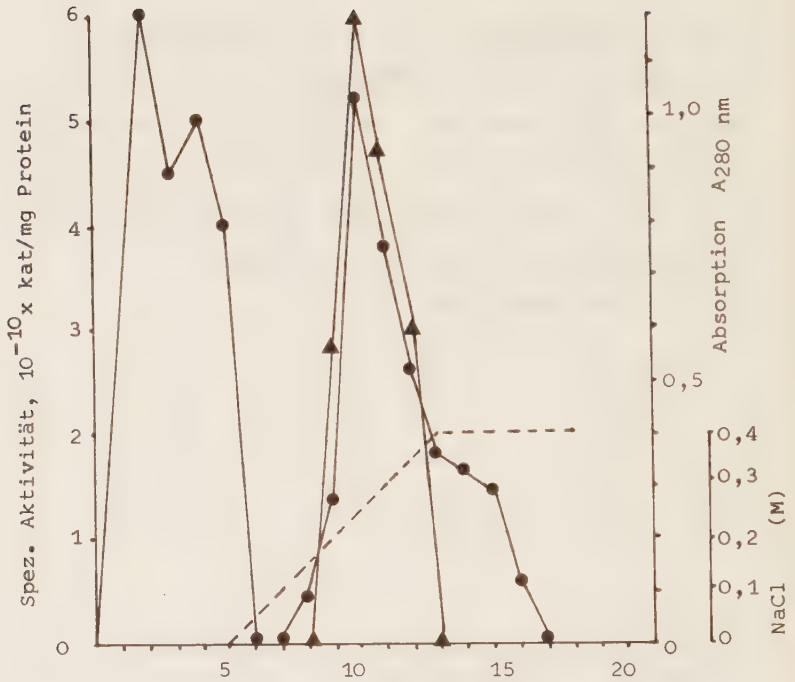


Abb. 7. Ionenaustauscherchromatographie von α -Glucosidase auf einer DEAE-Cellulose-Säule (10,0 x 1,2 cm), die mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) voräquilibriert worden war. An das Harz gebundenes Protein wurde mit einem

linearen Salzgradienten (0-0,4 M Natriumchlorid in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8)) eluiert. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 8 ml. ●, Protein; ▲, spezifische Aktivität der vesikulären α -Glucosidase.

Die Reinigung wurde durch Solubilisierung der vesikulären α -Glucosidase mit Tween 85 fortgesetzt. Um optimale Bedingungen für die Solubilisierung zu finden, wurden Proben des vesikulären Enzymes mit Tween 85, Tween 20, Triton X-100 und Natriumcholat inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde 5 Tage bei 8 °C aufbewahrt. In 24-stündigen Intervallen wurden dem Inkubationsansatz 0,1 ml-Proben entnommen und auf Restaktivität von α -Glucosidase hin untersucht. Wie Abb. 8 zeigt, konnten die besten Resultate bezüglich der Restaktivität mit Tween 85 erzielt werden.

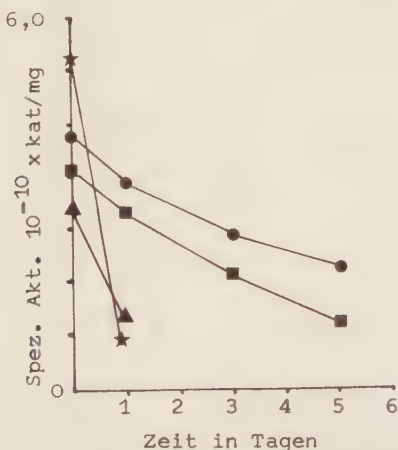


Abb. 8. Stabilität der mit verschiedenen Detergentien solubilisierten vesikulären α -Glucosidase.

Je 0,330 mg/ml Protein (Endkonzentration) wurden mit ▲ Tween 20 (0,2 % w/v Endkonzentration), ● Tween 85 (0,1 % w/v) und ■ Triton X-100 (0,5 % w/v), und 0,640 mg/ml Protein mit ★ Natriumcholat (0,1 % w/v in 0,4 M Natriumchlorid pH 8,0) inkubiert. In Zeitintervallen von 24 h wurden Aliquots entnommen und auf Restaktivität getestet.

Um für die weitere Reinigung eine optimale Konzentration an Tween 85 herauszufinden, wurde vesikuläre α -Glucosidase mit verschiedenen Konzentrationen des Detergens inkubiert und auf Enzymaktivität getestet. Unter Standardtest-Bedingungen konnte die höchste Aktivität bei einem Verhältnis von 1 : 0,34 Detergens zu Protein nachgewiesen werden. Dieses Verhältnis entspricht einer Konzentration von 0,1 % (w/v) Tween 85 im Testansatz (vgl. Abb. 9).

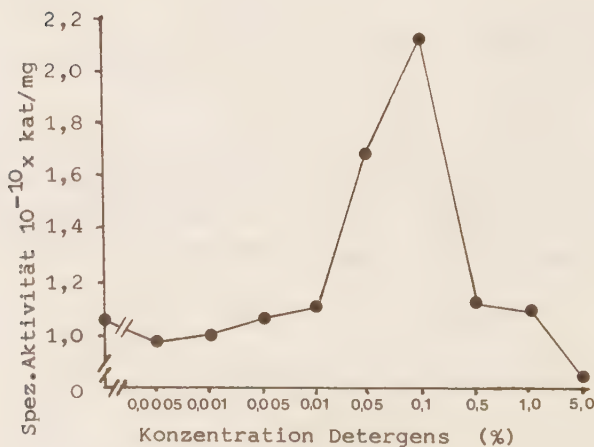


Abb. 9. Solubilisierung von partiell gereinigter, vesikulärer

α -Glucosidase mit Tween 85.

Aliquots von 0,17 mg/ml (Endkonzentration) Protein wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Tween 85 (0,005-50 mg/ml Detergens, Endkonzentration im Testansatz) inkubiert und auf α -Glucosidaseaktivität getestet.

Die auf 1 ml mit einer Amiconzelle (XM 50 Membran) ankonzentrierten Fraktionen der DEAE-Cellulose-Chromatographie, die α -Glucosidase enthielten, wurden auf eine Endkonzentration von 50 mg/ml Detergens gebracht und sofort auf ein Molekularsieb aufgetragen. Solubilisierte α -Glucosidase konnte bei diesem Reinigungsschritt von der Hauptmasse an Protein abgetrennt werden (Abb. 10).

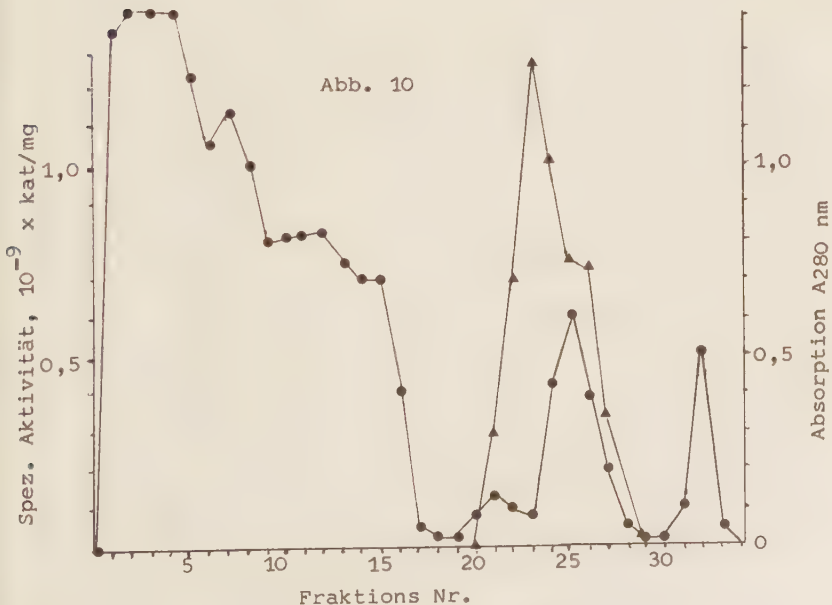


Abb. 10. Reinigung solubilisierter α -Glucosidase auf einem Molekularsieb, Biogel P-100 (60,0 x 2,25 cm). Das Säulenmaterial war mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8), der 0,05 % (w/v) Tween 85 enthielt, äquilibriert worden. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 1,5 ml. • Protein; ▲ spezifische Aktivität.

α -Glucosidase-enthaltende Fraktionen wurden nochmals auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen, von der α -Glucosidase bei einer Konzentration von 0,4 M Natriumchlorid in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8), der 0,05 % Tween 85 enthielt, eluiert werden konnte, wie Abbildung 11 zeigt. Die Ergebnisse der Reinigung der membrangebundenen α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

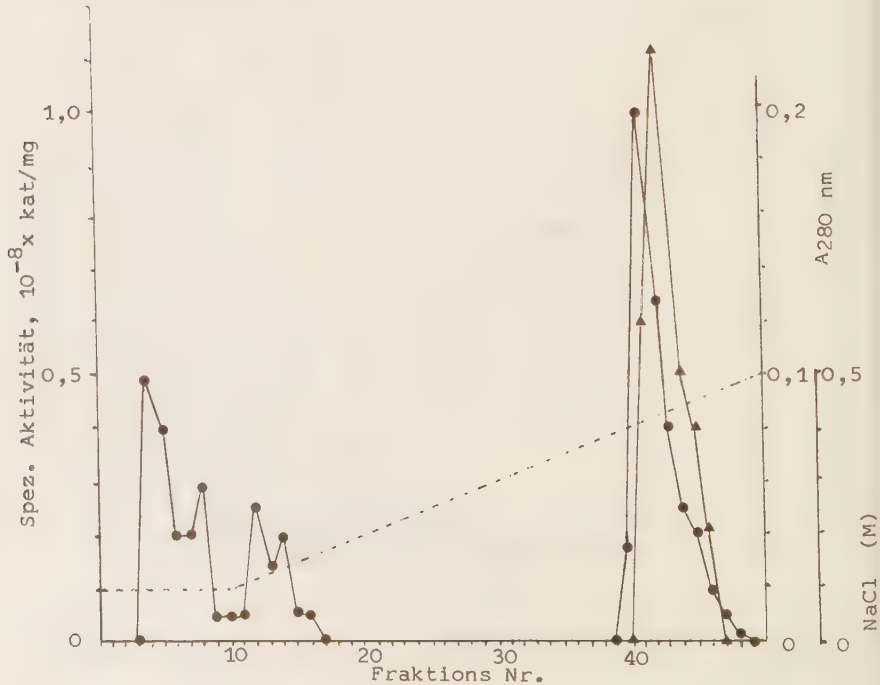


Abb. 11. Elutionsverhalten solubilisierter α -Glucosidase auf einer DEAE-Cellulose-Säule (2,0 x 1,2 cm).

Das Enzym wurde von der mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) und 0,05 % Tween 85 äquilibrierten Säule mit einem linearen Salzgradienten (0,1-0,5 M Natriumchlorid im gleichen Puffer) eluiert und in 1,2 ml-Fractionen aufgefangen. ● Protein, ▲ spezifische Aktivität.

6.1.7. Kriterien für die Reinheit der α -Glucosidase

Voraussetzung für die Charakterisierung des Enzymes ist die Gewißheit, daß außer α -Glucosidase keine weiteren amylolytischen Aktivitäten in der gereinigten Enzympräparation vorhanden sind. Um festzustellen, ob noch irgend eine andere amylolytische Aktivität in der Präparation vorhanden ist, wurde mit Testansätzen von α -Glucosidase mit Amylose und Stärke eine Jodanfärbung durchgeführt. Weder α -Amylase noch Isoamylase konnten nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich nach Polyacrylamid Disc-Gelelektrophorese mit nativem Protein lediglich zwei Banden (vgl. Abb. 12). Die Hauptproteinbande ließ sich mit einer Anfärbung auf Aktivität korrelieren, die nach Wang und Gabriel⁶⁷ durchgeführt wurde. Durch Inkubation des Polyacrylamidgels mit Maltose wird Maltose freigesetzt, die ein Triphenyltetrazoliumchlorid zu einem Formazan reduziert. Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit SDS zeigte nur eine einzige Bande (Abb. 12), der an Hand von Referenzproteinen mit Molekulargewichten von 13 000 bis 100 000, ein Molekulargewicht von 27 000 $\pm$ 1 000 Daltons zugeordnet werden konnte.

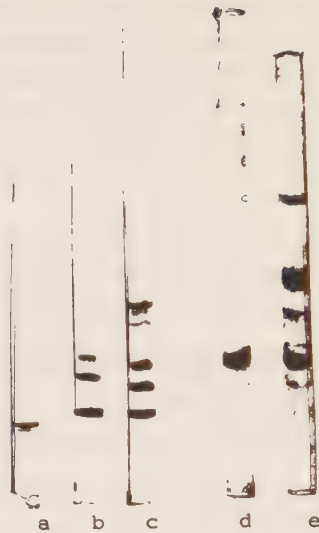


Abb.12. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von α -Glucosidase unter nativen und denaturierenden Bedingungen. (a) 60 μ g Protein des Eluates der 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie, (b) 120 μ g der α -Glucosidase, die vom Molekularsieb (Biogel P-100) eluiert worden war und (c) 160 μ g Protein nach der 1. DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie. Die Proben (a,b,c) in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) enthielten 0,1 % (w/v) SDS und wurden auf 7,5 % Polyacrylamidgele (pH 8,9) aufgetragen. Trenngel, Stacking Gel und Elektrodenpuffer (pH 8,3) enthielten ebenfalls je 0,1 % (w/v) SDS. (d) Disc-Elektrophorese Muster mit 120 μ g Protein nach der 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie und (e) 120 μ g Protein nach Gelfiltration auf Ultrogel ACA 44 mit 7,5 % Polyacrylamidgelen bei einem pH von 7,5 ohne SDS (Proteinbanden wurden mit Coomassie-Blau angefärbt).

Tabelle 5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Reinigung von α -Glucosidase

Präparation	Spez. Aktivität $\times 10^{-10}$ kat/mg Protein	Protein mg/ml	Gesamtaktivität $\times 10^{-10}$ kat	Vol. ml	Reinigungs- faktor	Aus- beute %
Vesikuläres Enzym	0,34	49,80	338,50	20	--	100
Ultrogel Aca 44 (120 x 2,0 cm)	1,34	10,80	144,70	10	3,94	42,75
1. DEAE-Cellulose (10 x 1,2 cm)	4,61	3,39	117,10	7,5	13,54	34,60
Biogel P-100 (60 x 2,25 cm)	75,00	0,29	110,35	5,0	220,61	32,60
2. DEAE-Cellulose (2,0 x 1,2 cm)	118,00	0,12	71,0	7,5	347,10	20,97

6.1.8. Eigenschaften der gereinigten α -Glucosidase

Das pH-Optimum der gereinigten α -Glucosidase wurde nach Inkubation von Aliquots der Präparation mit Puffern verschiedenen pH's bestimmt. Ein Maximum der Aktivität lag bei pH 6,8 (Abb. 13) während vesikuläres Enzym ein breites Optimum zwischen pH 6,5 und 7,0 hatte (nicht dokumentiert).

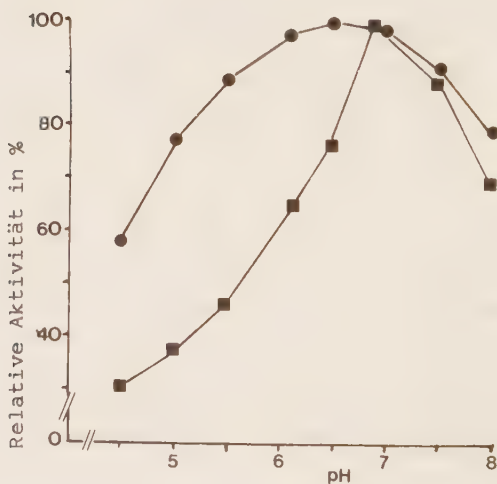


Abb. 13. pH-Optimum und pH-Stabilität des α -Glucosidase-angriffes auf p-Nitrophenyl- α -D-glucosid.

Gereinigte α -Glucosidase (6 μ g/ml Protein, Endkonzentration) wurde 30 min bei 38 °C in 50 mM Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten inkubiert und auf Aktivität getestet (■). Um eine Kurve für die pH-Stabilität zu erhalten (●), wurde α -Glucosidase 24 h bei 11 °C und verschiedenen pH-Werten aufbewahrt. Das Enzym wurde dann bei optimalem pH unter Standardbedingungen auf Aktivität getestet. Verschiedene pH-Werte wurden mit folgenden Puffern er-

halten : 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 4,0-6,5 ;
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,0-7,5 ; 50 mM
Tris/HCl, pH 7,0-8,0.

Nach Inkubation (30 min, pH 6,8) bei verschiedenen
Temperaturen wurde das Optimum der Enzymaktivität bei
38 °C bestimmt (Abb. 14). Oberhalb 45 °C nahm die
Aktivität des Enzymes drastisch bis auf 24 % bei 50 °C
ab (Enzymaktivität bei 38 °C wurde als 100 % gesetzt).

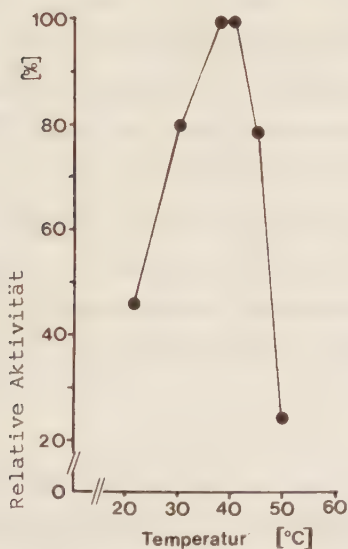


Abb. 14. Temperatur-Optimum der Enzymreaktion.
Aliquots der gereinigten α -Glucosidase (6 μ g/ml
Protein) wurden 30 min bei verschiedenen Tempe-
raturen unter Standardbedingungen inkubiert und
auf Enzymaktivität getestet.

Zur Bestimmung der pH-Stabilität des Enzymes wurden Proben der Präparation 24 h bei 11 °C aufbewahrt, anschließend auf den optimalen pH-Wert eingestellt und auf Restaktivität untersucht (Abb. 13).

α -Glucosidase zeigte ein breites Maximum zwischen pH 6,2 und pH 7,0.

Die Enzymreaktion verlief mit p-Nitrophenyl- α -D-glucosid bis 60 min mit 6,0 μ g/ml Enzym linear. Daher wurde die Anfangsgeschwindigkeit mit verschiedenen Substraten (Tabelle 6) innerhalb dieses Bereiches gemessen. Die höchsten Geschwindigkeiten wurden mit Saccharose und p-Nitrophenyl- α -D-glucosid festgestellt. Langsamere Geschwindigkeiten wurden mit Maltose, Maltotriose bzw. mit Isomaltose und Isomaltotriose gefunden. Aktivität gegenüber Amylose, löslicher Stärke, Phytoglykogen oder p-Nitrophenyl- β -D-glucosid war nicht nachweisbar. α -Glucosidase hydrolysierte Methyl- α -glucosid in einem Ausmaß, der geringfügig über der Nachweisgrenze lag.

Beide α -Glucosidase aus B. subtilis 6633 und 6051, ähnlich wie die α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens, zeigten eine deutliche Präferenz für p-Nitrophenyl- α -D-glucosid als Substrat, wenn die Enzymaktivität in Zellhomogenaten bestimmt wurde. B. subtilis 6051 enthielt bei gleicher Zellausbeute ca. 35 % weniger α -Glucosidase als B. subtilis 6633, wenn die Bakterien mit Maltose als die alleinige Kohlenstoffquelle kultiviert wurden.

Tabelle 6. Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion von B. amyloliquefaciens α -Glucosidase mit verschiedenen Substraten.

Standardtestansatz: 6 μ g/ml Protein, Substrat (Endkonzentration 6 mg/ml), 0,65 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8), der 50 μ g/ml Tween 85 enthielt. Inkubationszeit 15 min (100 % entsprechen der Aktivität von $5,9 \times 10^{-10}$ kat).

Substrat	Relative Enzymaktivität %
Maltose	40
Maltotriose	32
Isomaltose	30
Isomaltotriose	18
Lösl. Stärke	-
Amylose	-
Phytoglykogen	-
Saccharose	140
p-Nitrophenyl- α -D-glucosid	100
p-Nitrophenyl- β -D-glucosid	-
Methyl- α -D-glucosid	Spur

6.2. Extrazelluläre Polysaccharide von B. amyloliquefaciens

Bei der Reinigung der extrazellulären Enzyme aus dem Kulturmedium von B. amyloliquefaciens war aufgefallen, daß bei Enzymtests auf amylolytische Enzyme immer der Blindwert mit Enzym ohne Substrat einen erhöhten Wert aufwies. Da alle Enzympräparate sorgfältig dialysiert worden waren, konnte es sich bei diesem Polysaccharid nicht um ein dem Medium zugefügtes Kohlehydrat handeln. Wenn Isoamylase aus dem Kulturmedium dieses Bakteriums gereinigt werden sollte, wurden bei der Fraktionierung nach Molekularsiebchromatographie immer nur geringe Mengen des Enzymes frei von α -Amylase erhalten^{4,40}. Obwohl α -Amylase ein wesentlich geringeres Molekulargewicht (49 000)⁶ als Isoamylase (96 000)⁴⁰ besitzt, war eine vollständige Trennung beider Enzyme durch konventionelle Molekularsieb- und auch Ionenaustauschchromatographie nicht möglich. In den Fraktionen, die beide Enzyme enthielten, wurde außerdem ein mit Phenol/Schwefelsäure-Reagenz positiv reagierendes Polysaccharid nachgewiesen. Von B. amyloliquefaciens α -Amylase ist nicht bekannt, daß sie ähnlich der α -Amylase aus B. subtilis dimerisieren oder höhere Aggregationen bilden könnte²⁴. Der Effekt des scheinbar zu hohen Molekulargewichtes von α -Amylase wurde daher auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen, Isoamylase und α -Amylase, und einem oder mehreren Polysacchariden zurückgeführt. Es schien daher sinnvoll - zur Vertiefung des

Verständnisses der Natur des Sekretionsprozesses extrazellulärer Enzyme und zur Optimierung der Reinigung der Enzyme - zu untersuchen, ob (i) bei B. amylo-liquefaciens zusammen mit den extrazellulären Enzymen extrazelluläres Polysaccharid kosezerniert wird; (ii) sich die Sekretion der einzelnen Enzyme selektiv über die Inhibierung der Polysaccharidsynthese durch 2-Desoxy-D-glucose beeinflussen läßt; (iii) es für die extrazellulären Enzyme des α -Glucanstoffwechsels, Isoamylase und α -Amylase, ein gemeinsames oder aber ein für das einzelne Protein spezifisch kosezerniertes Polysaccharid gibt.

6.2.1. Zeitlicher Verlauf der Sekretion extrazellulärer Polysaccharide und Proteine mit und ohne 2-Desoxy-D-glucose während des Wachstums von B. amyloliquefaciens

Zur Bestimmung des Einflusses von 2-Desoxy-D-glucose auf Wachstum, Polysaccharid- und Proteinsekretion von B. amyloliquefaciens wurde dem Kulturmedium des Bakteriums 2-Desoxyglucose in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Abbildung 15 zeigt den Einfluß von 2-Desoxyglucose auf das Wachstum und die Fähigkeit, die im Medium vorgegebene Kohlenstoffquelle zu verwerten. Es zeigte sich, daß die Zellausbeuten in den Kulturen, die mit 2-Desoxyglucose gewachsen waren, mit steigenden Konzentrationen des Glucoseanalogons in dem Maße abnahm, wie die Fähigkeit zur Verwertung der Kohlenstoffquelle im Medium abnahm. Die Wachstumsraten der Kulturen mit 2-Desoxyglucose wichen nur geringfügig von denen ohne 2-Desoxyglucose im

Medium ab. Darüber hinaus konnte kein diauxisches Wachstum bei den Kulturen, die 2-Desoxyglucose im Kulturmedium enthielten, festgestellt werden. In einer Kultur, die neben 10 mg/ml Maltose 0,9 mg/ml Glucose enthielt, konnte ebenfalls keine Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Fähigkeit zur Verwertung der Kohlenstoffquelle beobachtet werden.

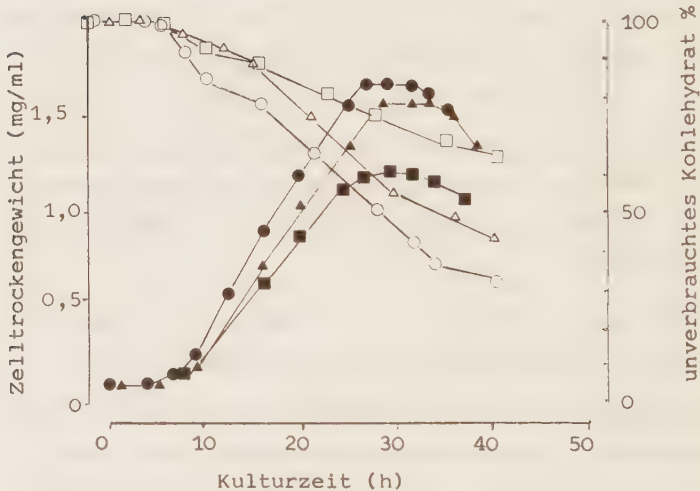


Abb. 15. Einfluß von 2-Desoxyglucose auf das Wachstum und die Verwertung von Kohlehydrat bei B. amyloliquefaciens.

B. amyloliquefaciens wurde in dem unter Material und Methoden beschriebenen Medium (pH 7,0) kultiviert. (Offene Symbole, Verwertung von Kohlehydrat; geschlossene Symbole, Wachstum). Als Kohlenstoffquelle diente (●) 10 mg/ml Maltose; (▲) 10 mg/ml Maltose und 0,15 mg/ml 2-Desoxyglucose; (■) 10 mg/ml Maltose und 0,90 mg/ml 2-Desoxyglucose. In verschiedenen Zeitabständen

wurden den Kulturen 10 ml Proben entnommen. 2 ml der Kulturprobe wurden direkt für die Bestimmung des Zelltrockengewichtes eingesetzt. Aus dem Rest der Probe wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt (48 000 x g, 20 min) und der resultierende klare Überstand für die Bestimmung des nicht verwerteten Kohlehydrates mit Glucoamylase und Glucose-Oxidase verwendet. Die Bestimmungen wurden gegen entsprechende Blindinkubationen durchgeführt.

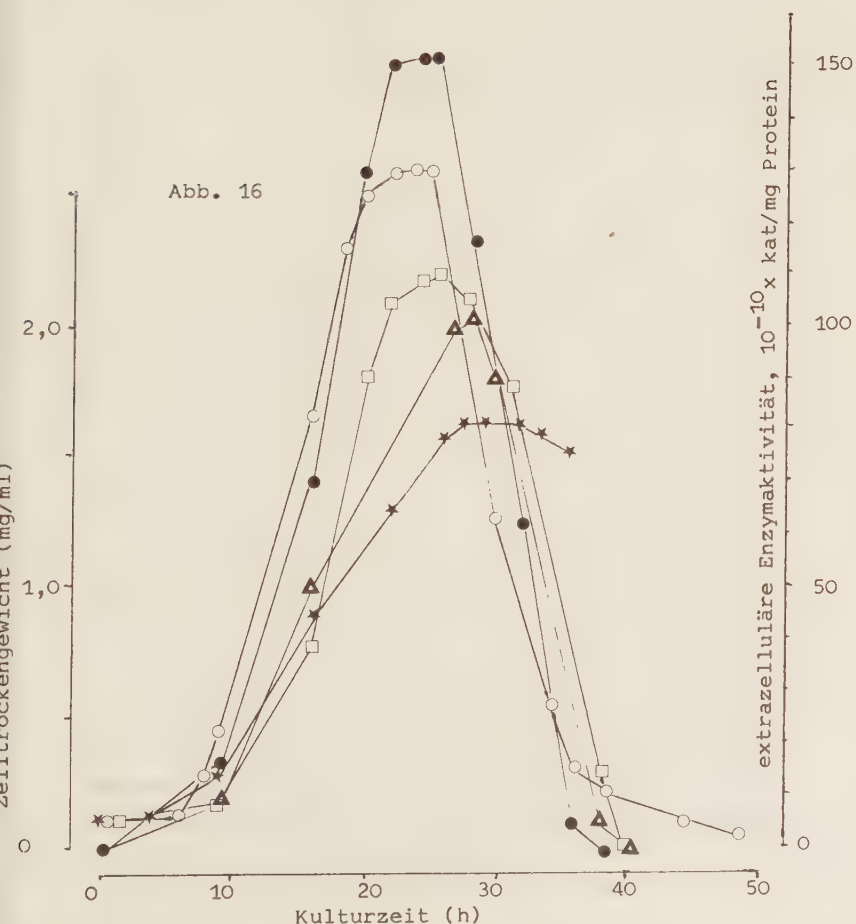


Abb. 16. Inhibierung der Sekretion von Isoamylase und α -Amylase durch 2-Desoxyglucose im Kulturmedium von B. amyloliquefaciens.

In verschiedenen Zeitabständen wurden der Kultur Proben entnommen (10 ml). Die Zellen wurden abzentrifugiert (48 000 x g, 20 min) und der klare Überstand wurde nach Dialyse in einer Ultrafiltrationzelle (Amicon, Membran PM 10) gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0), der 2 mM CaCl_2 enthielt, erschöpfend dialysiert. Das nichtdiffundierte Material diente nach Zentrifugation, um ausgefallenes Protein zu entfernen, als Enzymquelle für Tests auf Isoamylase und α -Amylase. ★ , Wachstum auf 1 % Maltose; ○ , Aktivität von α -Amylase und ● , Isoamylase bei 1 % Maltose; □ , α -Amylase bei 1 % Maltose und 0,015 % 2-Desoxyglucose; ▲ , α -Amylase bei 1 % Maltose und 0,09 % 2-Desoxyglucose.

Den Effekt, den die beiden eingesetzten Konzentrationen an 2-Desoxyglucose, 0,15 und 0,9 mg/ml, auf die Sekretion der Enzyme und α -Amylase haben, zeigt Abbildung 16.

In der Kultur, die nur 0,15 mg/ml 2-Desoxyglucose zusätzlich zu Maltose enthielt, war der Verlauf der Isoamylaseaktivität nicht mehr eindeutig bestimmbar, da sie im Rahmen der Meßgenauigkeit lag (5 μg reduzierende Endgruppen). Während die Aktivität von α -Amylase zu 25 % inhibiert wurde (spezifische Aktivität), war Isoamylaseaktivität nicht mehr definierbar, da die Aktivität als die Differenz zwischen der Freisetzung reduzierender Endgruppen aus Amylose und aus lösl. Stärke gemessen wurde. Bei 0,9 mg/ml 2-Desoxyglucose im Medium ist schließlich keine Isoamylase mehr vorhanden, da weniger reduzierende Endgruppen aus löslicher Stärke als aus

Amylose freigesetzt wurden. Eine Reduzierung der eingesetzten Enzymmenge zeigte, um den Effekt der höheren Affinität von α -Amylase zu Amylose im Gegensatz zu lösli. Stärke überzukompensieren, keinen Erfolg. Da wie die Untersuchung an α -Glucosidase gezeigt hatte, Maltose mutmaßlich intrazellulär von α -Glucosidase weiter abgebaut wird, sollte in einem Folgeexperiment der Einfluß von 2-Desoxyglucose auf dieses Enzym untersucht werden (vgl. Abb. 17).

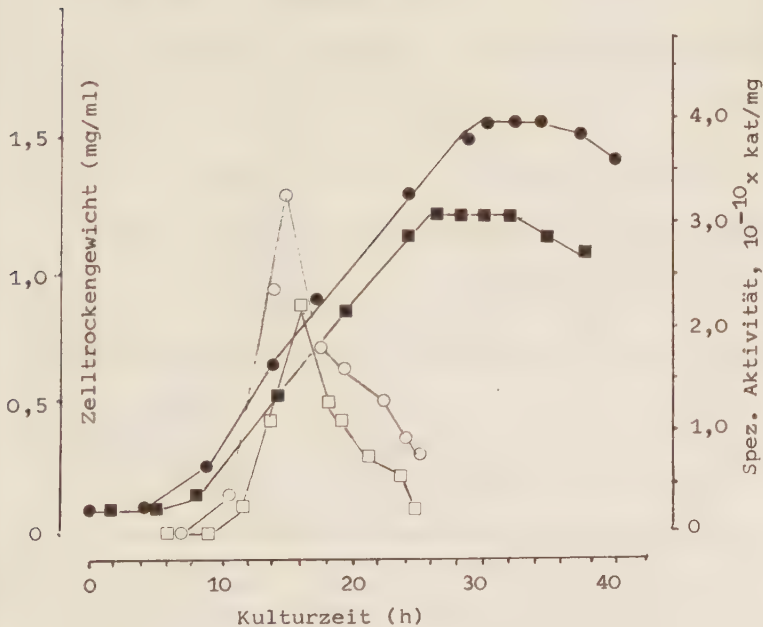


Abb. 17. Einfluß von 2-Desoxyglucose auf die spezifische Aktivität von intrazellulärer α -Glucosidase. In zwei parallel Kulturen, die einmal nur 1 % (w/v) Maltose und einmal 1 % Maltose plus 0,9 mg/ml 2-Desoxyglucose enthielten, wurde der Verlauf der α -Glucosidaseaktivität während des Wachstums der Bakterien bestimmt.

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie bei den Experimenten zur Induktion von α -Glucosidase durch verschiedene Kohlenstoffquellen. (Offene Symbole, spezifische Aktivität von α -Glucosidase; geschlossene Symbole Wachstum) ● , 1 % Maltose; ■ , 1 % Maltose plus 0,9 mg/ml 2-Desoxyglucose.

Wie bei dem Experiment zur Inhibierung der Isoamylase und der α -Amylase, kann unter dem Einfluß von 2-Desoxyglucose ebenfalls eine deutliche Beeinträchtigung der intrazellulären α -Glucosidase festgestellt werden. Gegenüber der Kontrollkultur wird eine Inhibierung der spezifischen Aktivität des Enzymes von 34,0 % beobachtet. Den bei einer Konzentration von 0,9 mg/ml feststellbaren recht drastischen Effekt (25 % Inhibierung der α -Amylase, 100 % Inhibierung der Isoamylase und 34 % Inhibierung der α -Glucosidase) steht lediglich eine Reduzierung von 26 % des Zelltrockengewichtes, 18 % des extrazellulären Proteins und 7 % des Polysaccharides gegenüber (vgl. Abb. 18). Eine genauere Betrachtung dieser Resultate zeigt, daß zwar die absoluten Mengen an Protein und Polysaccharid im Medium der inhibierten Kultur deutlich reduziert sind gegenüber der Normalkultur ohne 2-Desoxyglucose, jedoch die relativen Mengen bezogen auf das Zelltrockengewicht erheblich über den Werten liegen, die für die Normalkultur gefunden werden. Wodurch diese Stimulierung der Proteinsekretion von 104 mg Protein/mg Zelltrockengewicht auf 116 mg/mg Zelltrockengewicht, und die Stimulierung der Polysaccharidsekretion in der inhibierten Kultur von 165 μ g/mg Zelltrockengewicht auf 220

ug/mg Zelltrockengewicht hervorgerufen wird, ist ungeklärt.

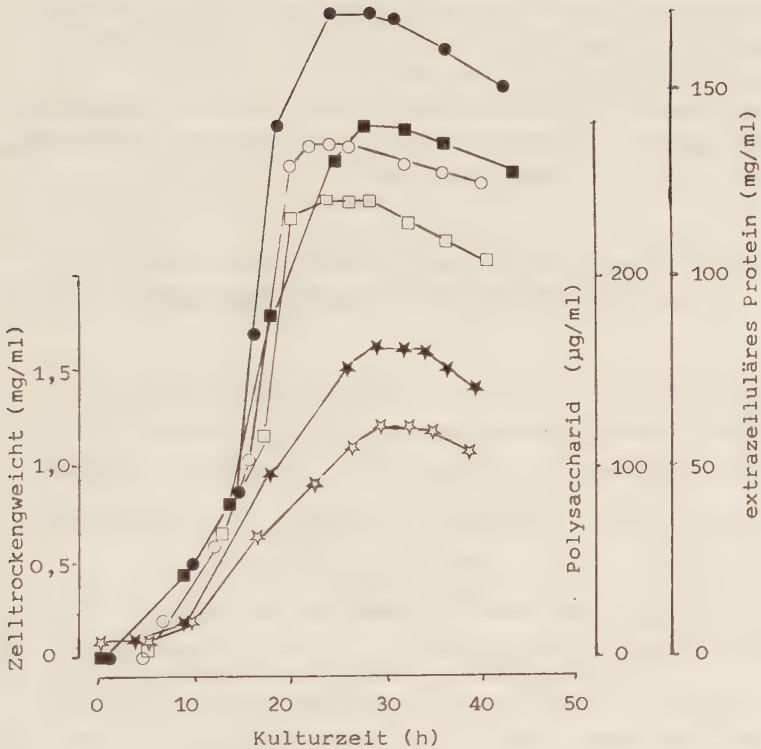


Abb. 18. Reduzierung des Polysaccharid- und der Proteinsekretion unter dem Einfluß von 0,9 mg/ml 2-Desoxyglucose im Kulturmedium von *B. amyloliquefaciens*. In verschiedenen Zeitintervallen wurden 10 ml-Proben dem Kulturmedium entnommen. Je 2 ml der Probe wurden zur Bestimmung des Zelltrockengewichtes eingesetzt. Mit dem Rest der Probe wurden, nach Entfernung der Zellen durch Zentrifugation (48 000 x g, 20 min), Bestimmungen des Protein- und Polysaccharidgehaltes der Proben durchgeführt.

Die Proben wurden in einer Amiconzelle erschöpfend gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) dialysiert, um noch vorhandene Kohlenstoffquelle aus dem Medium zu entfernen. Proteinbestimmungen wurden nach Fällung eines Aliquots mit 8 % Trichloressigsäure und Lösen des TCA-unlöslichen Niederschlages in einer 0,2 M Na_2CO_3 -Lösung nach Folin ausgeführt. Polysaccharid wurde mit Phenol/Schwefelsäure-Reagenz bestimmt.

● Protein, ○ Polysaccharid, ★ Wachstum bei 1% Maltose;
■ Protein, □ Polysaccharid, ☆ Wachstum bei 1 % Maltose plus 0,9 mg/ml 2-Desoxyglucose.

6.2.2. Reinigung von extrazellulärem Polysaccharid aus dem Kulturmedium von B. amyloliquefaciens

Da auf Grund der vorhergegangenen Versuche angenommen werden konnte, daß eine Wechselwirkung zwischen Protein- und Polysaccharidsekretion besteht, sollte zur Aufhellung der Inhibierungseffekt Polysaccharid, das mutmaßlich mit Protein assoziiert ist, gereinigt werden.

Aus 2 parallel angesetzten Kulturen, die entweder 1 % Maltose oder 1 % Maltose und 0,5 mg/ml 2-Desoxyglucose enthielten, wurden nach 26 h die Zellen durch Zentrifugation entfernt (48 000 x g, 45 min). Das zellfreie Medium wurde in einer Amiconzelle (Membran UM 2) gegen das dreifache Volumen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) dialysiert und anschließend mit einem Rotavapor eingedampft. Es wurde auf 1 l mit destilliertem Wasser gelöst und mit 600 g/l eine Ammoniumsulfatfällung bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag bei 28 000 x g

für 1 h abzentrifugiert, mit 300 ml Wasser aufgenommen und mit dem 3-fachen Volumen vorgekühltem (4 °C) Äthanol in der Kälte versetzt. Nach nochmals 24 h wurde der entstandene Niederschlag erneut abzentrifugiert und mit 15 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) aufgenommen. Je 10 ml der Polysaccharidpräparation aus der inhibierten und der nicht inhibierten Kultur wurden auf ein Molekularsieb, Biogel P-200, aufgetragen. Das Elutionsverhalten des Polysaccharides zeigt Abbildung 19. Es wurden jeweils 5 ml-Fractionen gesammelt, die auf Polysaccharid und Protein getestet wurden.

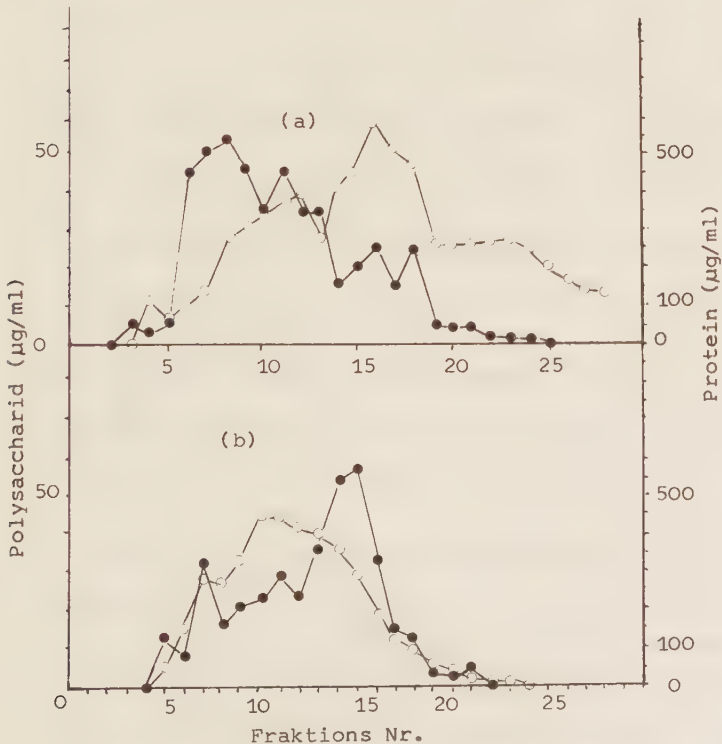


Abb. 19. Elutionsprofil von Polysaccharid aus dem Kulturmedium von B. amyloliquefaciens mit (a) Maltose (1 %) und (b) mit Maltose (1 %) und 0,5 mg/ml 2-Desoxyglucose als Kohlenstoffquelle.

Je 2 mg/ml Polysaccharid in 1,5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) wurden auf eine Säule (40 x 2,5 cm) mit Biogel P-200, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Fraktionen wurden nach Elution mit dem Arbeitspuffer auf Protein und Polysaccharid (wie in Legende zu Abb. 18 beschrieben) getestet. ○ Protein; ● Polysaccharid.

Auf Grund dieses Elutionsverhaltens lassen sich nur wage Aussagen machen. Während beim Polysaccharid eine Verschiebung der Masse des Polysaccharides zu niedrigeren Molekulargewichten (Fr. 15-20) hin und eine Reduzierung der Mengen bei höheren Molekulargewichten beobachtet wird, fehlt beim Protein das ausgeprägte Maximum in Fraktion 16 bei der Präparation aus der inhibierten Kultur. Die Fraktionen, die Polysaccharid enthielten, wurden zusammengefaßt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Das Elutionsverhalten der Präparation aus der nicht inhibierten Kultur zeigt Abbildung 20 (a), während Abb. 20 (b) das Elutionsverhalten der Präparation aus der inhibierten Kultur darstellt.

Nach Elution der DEAE-Cellulose-Säule, auf die Polysaccharid aus der nicht inhibierten Kultur aufgetragen worden war, ließ sich eine deutliche Aufteilung in 4 Fraktionen erkennen. Eine acide Fraktion, die nicht auf dem Anionentauscherharz band und drei Fraktionen, die

auf dem Harz adsorbiert und teilweise erst bei sehr hohen Ionenstärken mit überlagertem pH-Gradienten eluiert wurden. Das Polysaccharid aus der inhibierten Kultur zeigte nach Ionenaustauscherchromatographie eine wesentlich stärkere Aufspaltung in Fraktionen. Die Verteilung auf mindestens 10 Hauptfraktionen deutet an, daß das in das Kulturmedium von B. amylo-liquefaciens sezernierte Polysaccharid keine homogene Zusammensetzung besitzt.

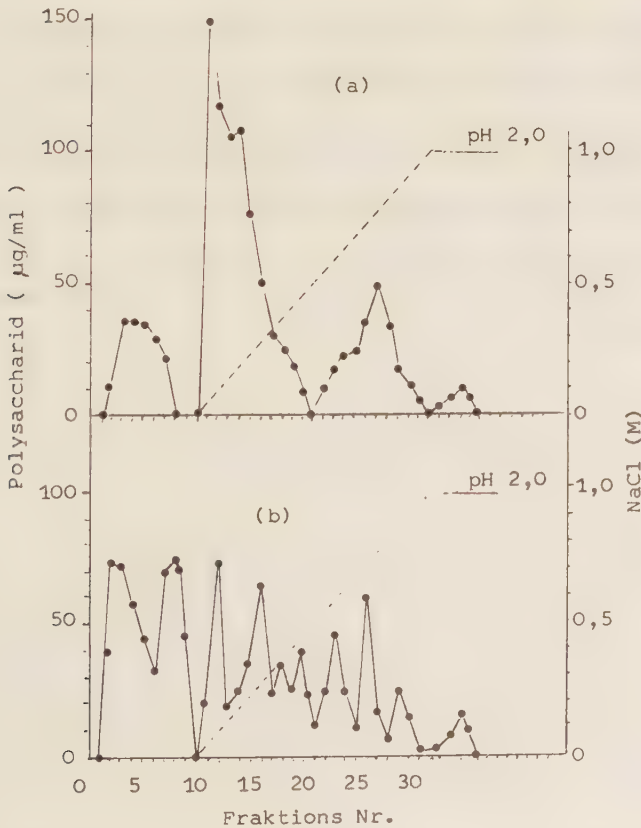


Abb. 20. Elutionsverhalten des Polysaccharides aus einer Kultur (a) mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle und (b) mit Maltose und 0,5 mg/ml 2-Desoxyglucose. auf einer Säule mit DE-32 (20 x 1,2 cm). Nach Auftragen der Probe wurde die Säule, die mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer äquilibriert war, zunächst nur mit dem gleichen Puffer eluiert. Nachdem kein weiteres Polysaccharid mehr mit dem Arbeitspuffer (pH 6,5) eluiert werden konnte, wurde die Elution mit einem linearen Kochsalzgradienten (0-1,0 M NaCl in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5) fortgesetzt. An diesen Gradienten schloß sich eine Elution mit 1,0 M NaCl (pH 2,0) an. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml gesammelt.

Der Eingriff durch 2-Desoxyglucose in die Polysaccharidsynthese und/oder Polysaccharidsekretion in diesem Bakterium führt zu tiefgreifenden Veränderungen in der Zusammensetzung des Polysaccharides. Deutlich sind die absoluten Mengen an adsorbierbaren Polysaccharid vermindert, während die Mengen an Polysaccharid aus der inhibierten Kultur, die nicht an das Ionenaustauscherharz binden, vermehrt sind.

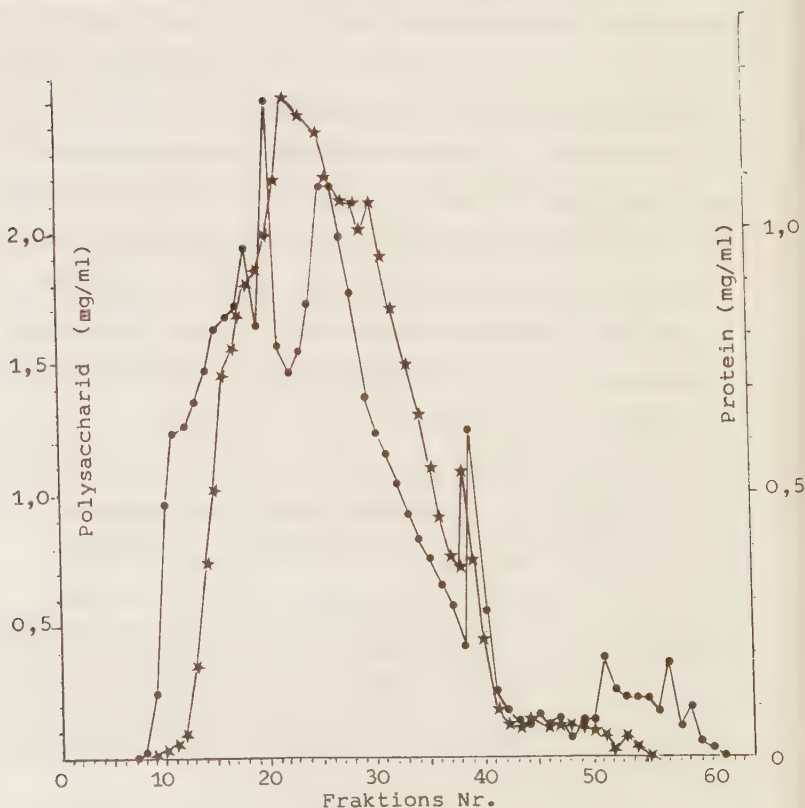
6.2.3. Reinigung der spezifischen Polysaccharide von Isoamylase und α -Amylase aus dem Kulturmedium

Wegen der Aufspaltung des Polysaccharides aus der inhibierten Kultur nach Ionenaustauschchromatographie in mehrere Fraktionen sollte untersucht werden, ob im Kulturmedium von B. amyloliquefaciens eventuell separierbare spezifische Polysaccharide der beiden Enzyme Isoamylase und α -Amylase zu finden sind. Dazu wurden die

Zellen aus 8 l Kultur in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von 0,8 mg/ml Zelltrockengewicht durch Zentrifugation (48 000 x g, 1 h) aus dem Medium entfernt. Das zellfreie Medium wurde in einer Amiconzelle (Membran UM 2) auf 1,5 l eingeeengt und gegen das dreifache Volumen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) dialysiert. Das nicht diffundierte Material wurde nochmals zentrifugiert, um ausgefallenes Protein zu entfernen und anschließend gefrieretrocknet. Das Lyophilisat wurde mit 600 ml 96 % igem Äthanol aufgenommen und 12 h in der Kälte (4 °C) stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wurde in 300 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) aufgenommen und nochmals mit dem dreifachen Volumen an Äthanol versetzt. Dieses Verfahren wurde noch zweimal wiederholt, bis ein weißes Präzipitat erhalten wurde. Der Niederschlag wurde in 110 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) gelöst und teilweise zur weiteren Reinigung auf ein Molekularsieb eingesetzt (vgl. Abb. 21).

Zur weiteren Reinigung des Polysaccharides wurden die Fraktionen, die Polysaccharid enthielten zusammengefaßt und auf eine Anionentauschersäule aufgetragen. Isoamylase und α -Amylase wurden nicht auf dem Harz adsorbiert und konnten durch einfache Elution mit dem Arbeitspuffer eluiert werden. Das Elutionsprofil der beiden Enzyme und des Polysaccharides ist in Abbildung 22 wiedergegeben.

Abb. 21. Säulenchromatographie von Polysaccharid auf einem Molekularsieb, Sepharose 6-B (90 x 2,5 cm). 20 ml der Polysaccharidpräparation wurden auf die Säule, die mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) äquilibriert war, aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen von 5 ml aufgefangen. ● Protein; ★ Polysaccharid.



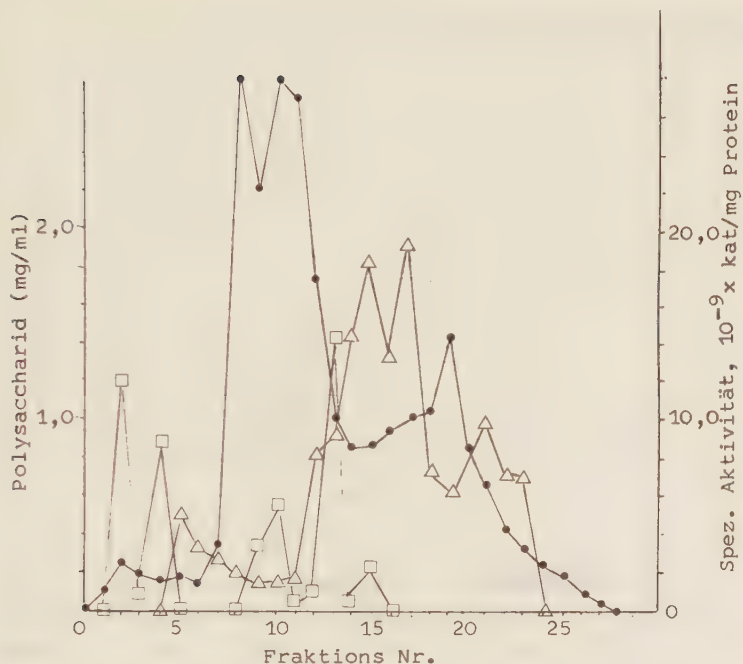


Abb. 22. Adsorption des Polysaccharides an einer DEAE-Cellulose-Säule (DE-32, 25 x 2,5 cm).
 Nach der Elution vom Molekularsieb wurden die Fraktionen, die Polysaccharid enthielten auf eine Anionentauschersäule aufgetragen und mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) eluiert. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt.
 ● Polysaccharid; □ spezifische Aktivität von Isoamylase und △ von α-Amylase.

Fraktionen 1-4 und Fraktionen 14-23 wurden zusammengefaßt und in einer Amiconzelle (Membran UM 2) auf 1 ml bzw. 2 ml eingengt und anschließend nochmals über ein Molekularsieb gegeben. Die weitere Reinigung der Fraktionen, die ausschließlich α-Amylase enthielten zeigt Abb. 23, während die Trennung von Isoamylase und Polysaccharid in

Abbildung 24 dargestellt ist.

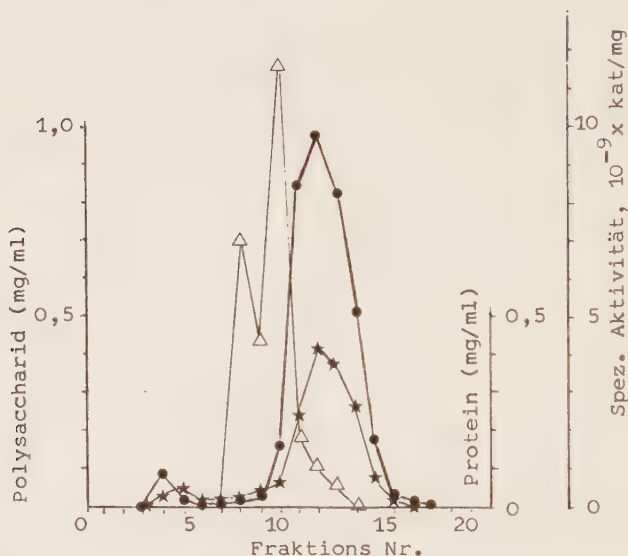


Abb. 23. Trennung von α -Amylase und Polysaccharid auf einem Molekularsieb, Biogel P-100 (40 x 2,2 cm), das mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer eluiert und die aufgefangenen Fraktionen hatten ein Volumen von 2,5 ml. ★ Protein; ● Polysaccharid; △ spezifische Aktivität von α -Amylase.

Isoamylase und α -Amylase ließen sich bei dieser Art der Aufarbeitung des Kulturmediums vollständig von einander trennen. Polysaccharid, das bei Neutralsalzfällung⁴⁰ stets mit den beiden Enzymen zusammen nach Molekularsiebchromatographie eluiert wurde, konnte, wenn auch mit Protein assoziiert, getrennt in zwei Hauptfraktionen isoliert werden.

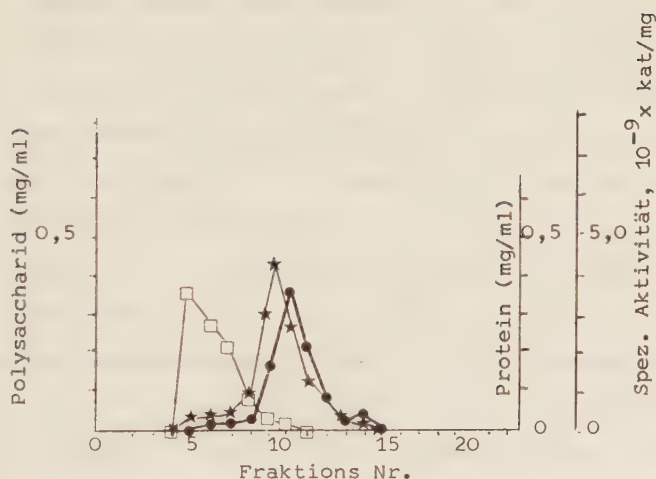


Abb. 24. Trennung von Isoamylase und Polysaccharid auf einem Molekularsieb, Biogel P-100 (20 x 1,2 cm). Die Säule, die mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer äquilibriert war, wurde mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2,5 ml aufgefangen.

★ Protein; ● Polysaccharid; □ spezifische Aktivität von Isoamylase.

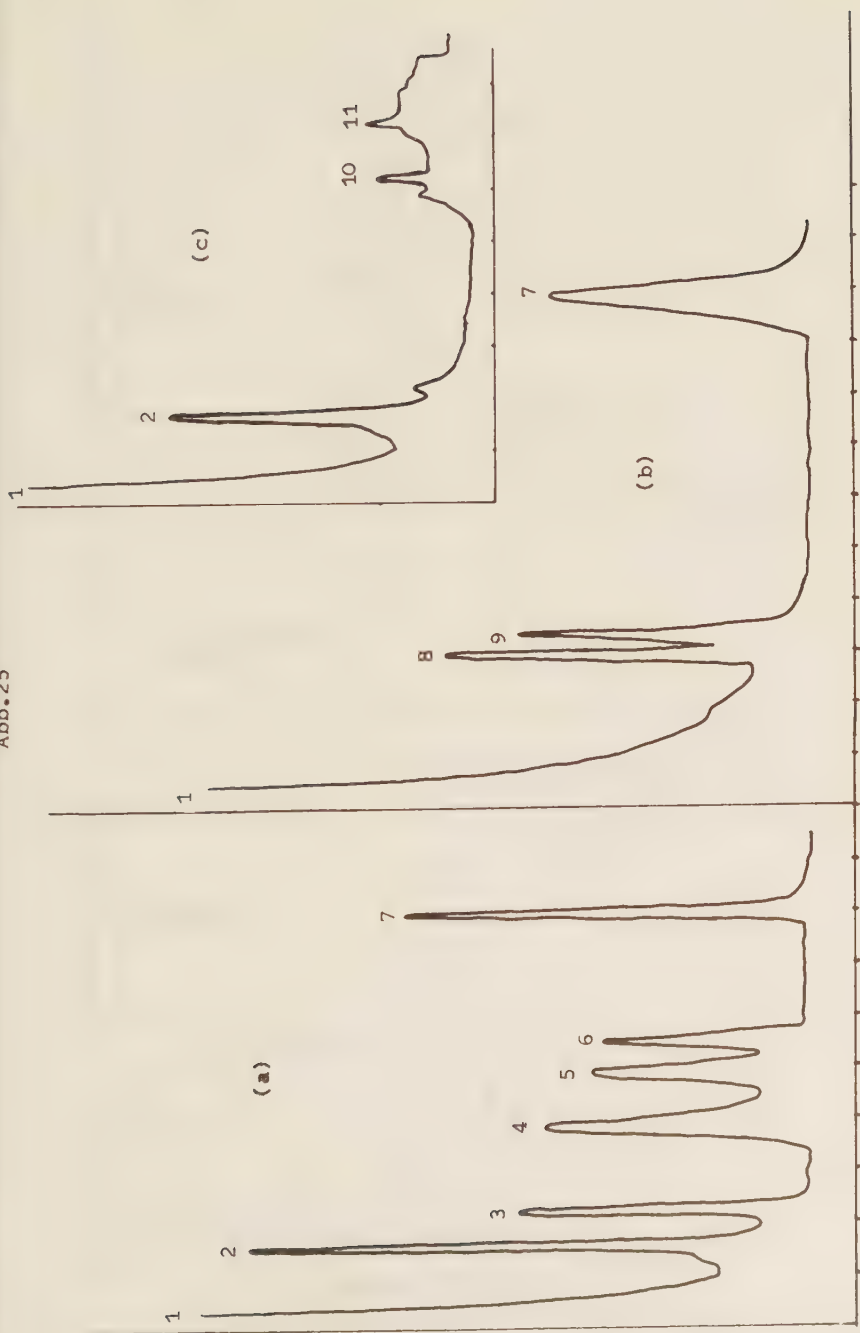
Die Ergebnisse dieses Experimentes werden dahingehend interpretiert, daß zusammen mit den beiden Enzymen Isoamylase und α -Amylase zwei spezifische Polysaccharide in das Kulturmedium von B. amyloliquefaciens sezerniert werden.

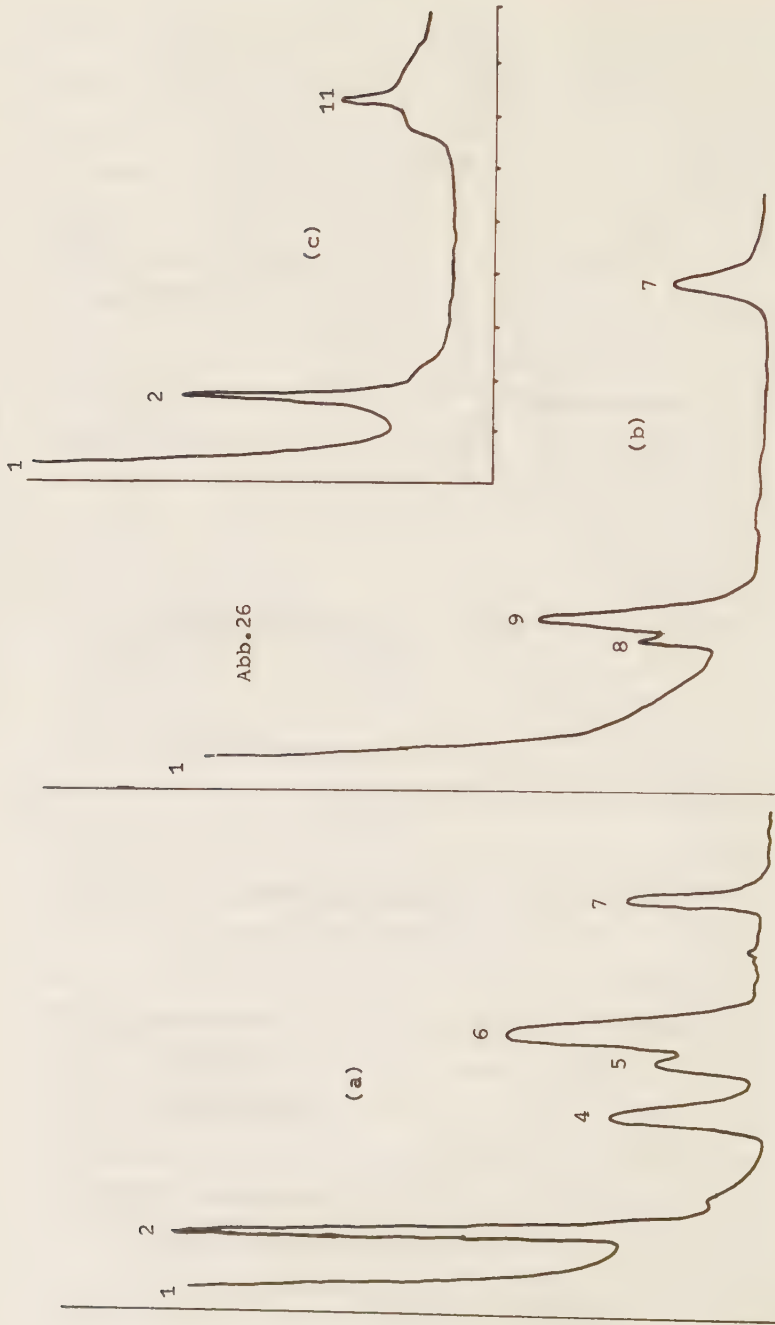
6.2.4. Zusammensetzung des Polysaccharides aus dem Kulturmedium von B. amyloliquefaciens

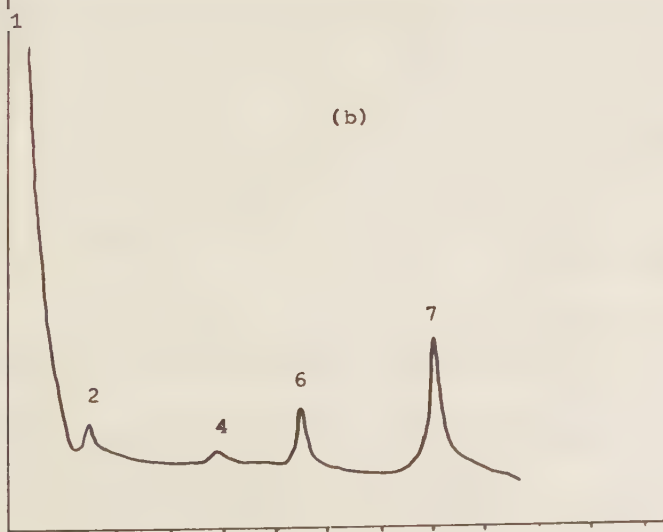
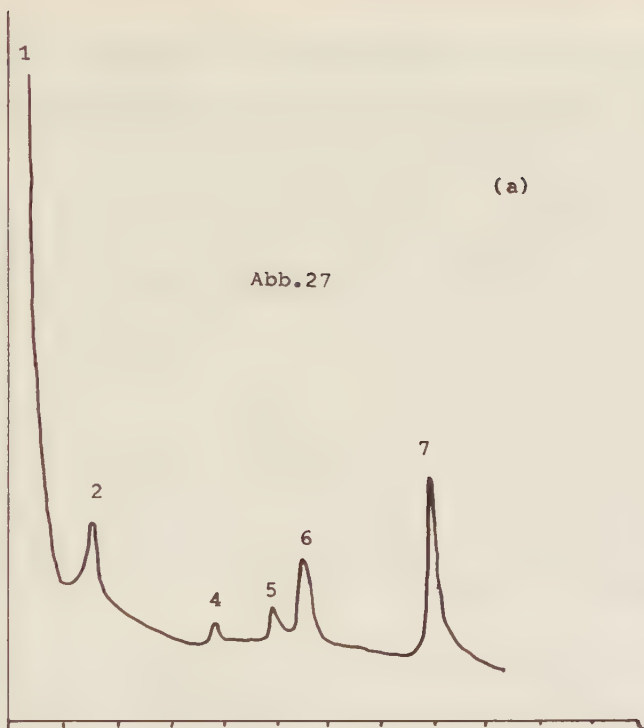
Zur Bestimmung der Gesamtzusammensetzung des Polysacchar-

rides, das wie unter 6.2.2. beschrieben isoliert wurde, wurden 10 mg Polysaccharid in Lösung in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft, mit 2 M HCl aufgenommen und in einem evakuierten, abgeschmolzenen Reagenzglas bei 100 °C hydrolisiert (4 h). Das Hydrolisat wurde abzentrifugiert und der klare Überstand über eine Säule (Pasteur-Pipette, 2 ml Bettvolumen) mit Anionentauscher, Dowex 1 x 4, in der Formiatform und Kationentauscher, Dowex 50 WX 4, in der H⁺-Form gegeben. Es wurde zunächst nur mit Wasser zur Elution der Neutralzucker gewaschen. Anschließend folgte eine Elution mit 5 ml 1 N NH₄OH. Dieses Eluat wurde nochmals auf eine Säule mit Kationentauscher (Dowex 50 WX 4, 100-200 mesh, in der H⁺-Form, 1 ml Bettvolumen) aufgetragen. Auf dieser Säule wurden die Hexosamine adsorbiert, während die eventuell vorhandenen Uronsäuren sofort mit Wasser eluiert wurden. Abschließend wurde die Säule nochmals mit 1 N NH₄OH gewaschen. Die Eluate wurden mehrmals auf einem Rotavapor abgedampft, um Ameisensäure aus der Probe zu entfernen. Die spezifischen Polysaccharide von Isoamylase und α-Amylase wurden analog vorbehandelt.

Zur Analyse der Polysaccharide mit einem Gaschromatographen wurden Referenzchromatogramme mit Rhamnose, Mannose, Xylose, Galaktose, Glucose, Galaktosamin, Glucosamin, Glucuronsäure und Galakturonsäure angefertigt. Die Abbildung 25 zeigt die Referenzchromatogramme und Abbildungen 26 und 27 stellen die Resultate der Analyse des Gesamtpolysaccharides bzw. der spezifischen Polysaccharide von Isoamylase und α-Amylase dar.







Erläuterungen zu den Abbildungen 25, 26 und 27.

Abb. 25. Retentionszeiten der Vergleichssubstanzen (a) Rhamnose (2), Xylose (3), Mannose (4), Galaktose (5), Glucose (6) und myo-Inosit (7); Retentionszeiten von (b) Galaktosamin (8) und Glucosamin (9) mit dem internen Standard myo-Inosit (7); (c) Retentionszeiten von Galakturonsäure (10) und Glucuronsäure (11) mit dem internen Standard Rhamnose (2). (1) Lösungsmittel. Säule, 3 % Silicon SE-30 auf Chromosorb G WA, 2 m, 1/8"; Temperatur von 160-220 °C, wie unter Material und Methoden beschrieben. Injektortemperatur, 265 °C; Detektortemperatur, 265 °C; Dämpfung, 512×10^{-11} . Es wurden jeweils 10 µl einer Mischung von 6 mg der o.g. Vergleichssubstanzen in 0,6 ml N-Trimethylsilylimidazol injiziert. Auf der Ordinate ist die Retentionszeit aufgetragen. Ein Teilstrich entspricht 5 min.

Abb. 26. Retentionszeiten der im Gesamtpolysaccharid gefundenen Neutralzucker nach Ionenaustauscherchromatographie (a), interener Standard, myo-Inosit (7) (40 min). Gaschromatogramm (b) von gefundenen Hexosaminen, Galaktosamin (8) und Glucosamin (9) mit dem internen Standard myo-Inosit (7) (48 min). Temperatur der Säule, 170 °C isotherm. Alle übrigen Daten wie bei Abb. 25. Dämpfung, 256×10^{-11} . (c) Retentionszeit von Glucuronsäure (11) (37 min) mit dem internen Standard Rhamnose (2). Es wurden 5 µl injiziert. Dämpfung, 126×10^{-11} . Temperaturprogramm wie bei Neutralzuckern.

Abb. 27. Zusammensetzung der Neutralzucker des spezifischen Polysaccharides von α -Amylase (a) und (b) von Isoamylase. Temperaturprogramm für (a) und (b) wie bei Abb. 25 von 160-220 °C. Alle weiteren Daten ebenfalls wie bei der Bestimmung der Vergleichssubstanzen. Interner Standard (7) myo-Inosit. Dämpfung, 126×10^{-11} .

Bei der Analyse des Gesamtpolysaccharides aus dem Kulturmedium von B. amyloliquefaciens konnten folgende Neutralzucker bestimmt werden : Rhamnose, Mannose, Galaktose und Glucose (Abb. 26). Nach Abtrennung der Neutralzucker über Ionenaustauscher wurden die beiden Hexosamine (Abb. 26 b) Galaktosamin und Glucosamin und eine Uronsäure, Glucuronsäure (Abb. 26 c) nachgewiesen.

Nach der Reinigung und Isolierung der spezifischen Polysaccharide von Isoamylase und α -Amylase ergab sich bei der Analyse insofern eine Schwierigkeit, daß beide Polysaccharide mit einer in Methanol löslichen Substanz stark kontaminiert waren, die sich auch nicht auf einem Ionenaustauscher abtrennen ließ. Diese Substanz, deren Signal bei der Gaschromatographie bei einer Anfangstemperatur des Säulenofens von 160 °C mit dem Signal des Lösungsmittels zusammenfiel, verhinderte, daß größere Mengen an Polysaccharid silyliert werden konnten. Eine Erhöhung der Detektorempfindlichkeit hätte dazu geführt, daß das Signal für Rhamnose in Abbildung 27 (a) und (b) nicht mehr zu erkennen gewesen wäre.

Für die Zusammensetzung des spezifischen Polysaccharides der α -Amylase (Abb. 27 a) konnten lediglich Rhamnose, Mannose, Galaktose und Glucose nachgewiesen werden. Hexosamine, Uronsäuren und Pentosen konnten bei dieser Aufarbeitung nicht entdeckt werden. Das mit Isoamylase assoziierte Polysaccharid enthielt neben Rhamnose und Glucose eine Spur Mannose (Abb. 27 b).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen sich wie folgt zusammenfassen: Zusammen mit den Enzymen der α -Glucanverwertung im Medium, die unter physiologischen Bedingungen sezerniert werden, werden spezifische Polysaccharide kosezerniert. Soweit die Resultate der gaschromatographischen Analyse gedeutet werden können, besitzen diese Polysaccharide eine verschiedene Zuckerzusammensetzung. Die selektive Totalinhibierung der Isoamylaseaktivität durch 2-Desoxyglucose deutete ebenfalls eine verschiedene Zusammensetzung der einzelnen Polysaccharide an.

6.3. Aspekte des endogenen α -Glucanstoffwechsels in B. amyloliquefaciens

Die Verwertung extrazellulärer Glucane, die im Medium von B. amyloliquefaciens als Kohlenstoffquelle dienen, stellt einen wesentlichen Aspekt des exogenen α -Glucanstoffwechsels dar. Das Schicksal der aus extrazellulären α -Glucanen stammenden Glucose repräsentiert im endogenen Stoffwechsel als Energiequelle einen anderen bedeutenden Aspekt des α -Glucanstoffwechsels in diesem Bakterium. Zu betrachten ist einmal die intrazelluläre Einmündung der Abbauprodukte von extrazellulären α -Glucanen in den Intermediärstoffwechsel, der Abbau von Maltodextrinen und Maltose mittels α -Glucosidase und eventuell α -Amylase; zweitens die Bereitstellung von Zuckern für die Synthese extrazellulärer Polysaccharide, die mit den extrazellulären Proteinen kosezerniert werden; und drittens die Funktion von Glucose zum Aufbau von intrazellulären Poly-

glucosen als Speicherkohlehydrat.

Während des raschen Wachstums des Bakteriums in der exponentiellen Wachstumsphase begann das mit Phenol/Schwefelsäure-Reagenz bestimmbare extrazelluläre Polysaccharid zu akkumulieren. In dieser Phase ließen sich auch zellgebundene Zucker mit dem gleichen Reagenz bestimmen, die als Maß für das Zellwachstum herangezogen werden könnten. Mit dem spezifischen Glucoamylase/Glucose-Oxidase-Reagenz hingegen ließ sich kaum zellgebundenes Polysaccharid nachweisen. Erst zu Beginn der stationären Wachstumsphase stieg der Anteil der als Polyglucose bestimmbaren Polysaccharide merklich an, um dann in der Mitte der stationären Phase einen konstanten Wert pro Zelle zu erreichen. Das späte Auftauchen dieses als Polyglucose mit Glucoamylase und Glucose-Oxidase bestimmbaren Polysaccharids ließ vermuten, daß es sich hierbei um ein Reservekohlehydrat handelte.

6.3.1. Isolierung und Charakterisierung von Glykogen aus B. amyloliquefaciens

Unter normalen Wachstumsbedingungen konnte nur wenig α -Glucan in den Zellen von B. amyloliquefaciens in der stationären Wachstumsphase gefunden werden. Wenn dagegen stickstoffbegrenzende Wachstumsbedingungen vorgegeben wurden, akkumulierte in den Zellen in der späten exponentiellen und frühen stationären Phase ein α -Glucan. Da B. amyloliquefaciens Glykogen bisher noch nicht untersucht worden ist, sollten einige Charakteristika dieses

Glykogens, wie das Ausmaß des Angriffs von β -Amylase, durchschnittliche Kettenlänge oder Spektrum des Jodkomplexes zum Vergleich der Kettenlänge mit anderen Glykogenen bestimmt werden. Nach sorgfältiger Reinigung des Glykogens, wie unter Material und Methoden beschrieben, wurde kein Unterschied bei der Bestimmung der Masse des Polysaccharides entweder mit Glucoamylase und Glucose-Oxidase oder mit Phenol/Schwefelsäure-Reagenz festgestellt. Daher konnte angenommen werden, daß in der Präparation keine Zucker außer α -Glucane vorhanden waren.

Wenn B. amyloliquefaciens Glykogen von einem Überschuß an β -Amylase (spezifische Aktivität $0,98 \times 10^{-8}$ kat/mg Protein) angegriffen wird, lassen sich 26,5 % des in der Probe enthaltenen Glykogens als Maltose nachweisen. Durch diese Behandlung des Glykogens wird ein relativ großes Grenzdextrin erhalten, was auf eine kurze durchschnittliche Kettenlänge hindeutet, da β -Amylase keine 1,6- α -glucosidischen Bindungen umgehen kann und so mindestens 2 Glucosylreste vor dem Verzweigungspunkt die Hydrolyse der Seitenkette beendet. Dieser Wert für die β -Amylosis von B. amyloliquefaciens Glykogen liegt in der Größenordnung, die auch für Glykogen anderen Ursprungs gefunden worden ist¹⁵.

Die durchschnittliche Kettenlänge des Glykogens, $\overline{CL} = 8,6$, wurde aus dem Verhältnis der Gesamtmenge Polysaccharid zu der Menge an reduzierenden Endgruppen, die mit Isoamylase aus dem Glykogen freigesetzt wurden, nach Gunja-

Smith et al.²² bestimmt. Falls diese zur Kettenlängenbestimmung verwendbare enzymatische Methode angewendet wird, muß sichergestellt werden, daß alle Verzweigungspunkte in Glykogen von Isoamylase hydrolysiert wurden. Als Kontrolle wurde daher Glykogen nacheinander mit Isoamylase und dann mit einem Überschuß an β -Amylase inkubiert, wodurch Glucose nur aus Ketten mit einer ungeraden Anzahl an Glucosyleinheiten entstehen kann. Quantitative und selektive Messung der freigesetzten Menge Glucose stellt eine weitere Methode zur Bestimmung der $\bar{CL}$ dar³⁸.

Die nach dieser Methode bestimmte durchschnittliche Kettenlänge war 8,8. Da β -Amylase Verzweigungspunkte nicht umgehen kann, war die Übereinstimmung beider Werte ein weiterer Beweis für die vollständige Hydrolyse der Verzweigungen in Glykogen durch Isoamylase. Der Wert für die durchschnittliche Kettenlänge von B. amyloliquefaciens Glykogen konnte durch die Daten bestätigt werden, die mittels Absorptionsspektroskopie erhalten wurden. Das Spektrum des Jodkomplexes von B. amyloliquefaciens Glykogen war nahezu identisch mit dem Spektrum, das von Phytoglykogen aus Süßmais ($\bar{CL}=7$) aufgenommen wurde. Im Vergleich zu einem Spektrum von Austerglykogen ($\bar{CL}=10$) war das Absorptionsspektrum von B. amyloliquefaciens Glykogen zu niedrigeren Wellenlängen verschoben.

6.3.2. Akkumulierung von Glykogen in Zellen von B. amyloliquefaciens

Unter stickstoffbegrenzenden Wachstumsbedingungen wurde Glykogen in der späten exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase intrazellulär akkumuliert, sofern im Medium noch ein Überschuß an Kohlenstoffquelle vorhanden war. Die Menge an Glykogen und die Zelldichte blieben über einen längeren Zeitraum konstant. Das Verhältnis Glykogen zu Zellprotein stieg in dem Maße, wie die Menge an Stickstoffquelle im Kulturmedium reduziert wurde (vgl. Abb. 28).

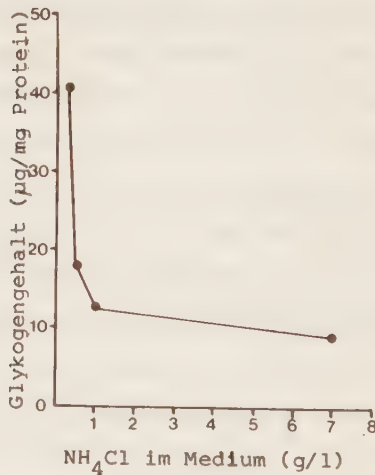


Abb. 28. Spezifischer Glykogengehalt der Zellen von B. amyloliquefaciens in Beziehung zu der im Medium vorgegebenen Menge an Stickstoffquelle.

B. amyloliquefaciens wurde in dem unter Material und Methoden beschriebenen Salzmedium (pH 7,2), das keine Aminosäuren enthielt, mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. Als Stickstoffquelle wurde

NH_4Cl in folgenden Konzentrationen eingesetzt : 0,25; 0,50; 1,00 ; 5,00; 7,00 g/l.

Die absoluten Mengen an Glykogen in den Zellen nahmen zwar nicht wesentlich zu, wohl aber erhöhte sich das Verhältnis Glykogen zu zellgebundenem Protein auf Grund der geringeren Zellausbeuten, die bei niedrigeren Konzentrationen an Stickstoffquelle im Medium erhalten wurden (Abb. 29).

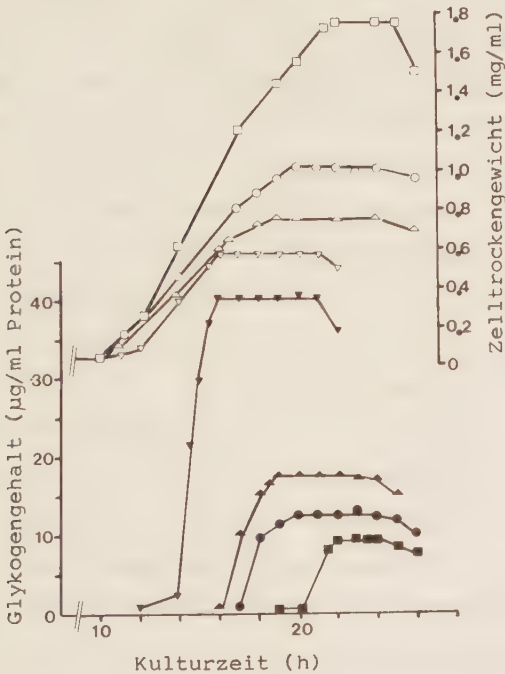


Abb. 29. Wachstum und Glykogenakkumulation in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle im Medium. Offene Symbole, Wachstum; geschlossene Symbole, spezifischer Glykogengehalt der Zellen. ■ 7 g/l; ● 1 g/l; ▲ 0,5 g/l; ▼ 0,25 g/l NH_4Cl .

6.3.3. Mobilisierung von Glykogen

Um zu zeigen, daß in den Zellen akkumuliertes Glykogen als Reservekohlehydrat und sofort verfügbare Energiequelle dienen kann, wurden Zellen unter stickstoffdefizienten Wachstumsbedingungen kultiviert (NH_4Cl , 0,25 g/l). Das Medium (pH 7,2) enthielt keine Aminosäuren, die als Kohlenstoffquelle und Stickstoffquelle in diesem Organismus verwertbar sind. Bei den vorgegebenen Bedingungen wird mit dieser Zusammensetzung des Mediums eine maximale Glykogenakkumulierung beobachtet. Wenn das Verhältnis Glykogen zu zellgebundenem Protein über einen Zeitraum von 2 h konstant geblieben war, wurde die Kultur zweigeteilt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und auf die ursprüngliche Zelldichte mit frischem Medium, das keine Stickstoffquelle (Kontrolle, C_1) und mit Medium, das weder Stickstoff- noch Kohlenstoffquelle enthielt (A) resuspendiert (vgl. Abb. 30).

Während die Menge an Glykogen pro Zelle in der Kontrolle (C_1) über einen Zeitraum von 3 h konstant blieb, nahm das Verhältnis Glykogen zu zellgebundenem Protein innerhalb von 2 h in der Teilkultur, in der weder Stickstoff- noch eine Kohlenstoffquelle vorhanden war (A), ab. Nach 3 h unter Hungerbedingungen verminderte sich die Zahl der vegetativen Zellen in der Kultur sehr stark. In einer parallelen Inkubation wurde nach Erhalt konstanter Werte für den Glykogengehalt in der stationären Phase die Kultur ebenfalls geteilt, gewaschen und auf die

ursprüngliche Zelldichte resuspendiert. In einer Teilkultur wurde lediglich die Stickstoffquelle fortgelassen, in einer anderen Teilkultur wurde die Kohlenstoffquelle bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Überschußes an Stickstoffträger (NH_4Cl , 2 g/l) fortgelassen. Die Ergebnisse dieses Versuches (nicht dokumentiert) waren identisch mit denen des vorgehenden Experimentes. Eine differentielle Änderung der Mobilisierungsgeschwindigkeit von Zellglykogen konnte gegenüber der Kultur, in der sowohl Stickstoffquelle, wie auch Kohlenstoffquelle fehlten, nicht nachgewiesen werden. Beide Versuche zeigten, daß nur unter stickstoffdefizienten Bedingungen bei einem Überschuß von Kohlenstoffquelle im Medium Glykogen intrazellulär akkumuliert werden kann.

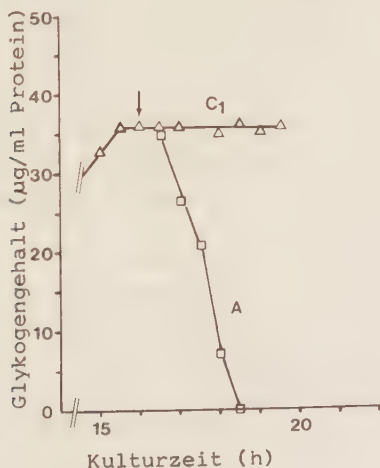


Abb. 30. Mobilisierung von Glykogen in Zellen bei Stickstoffmangel.

Zu dem mit einem Pfeil markierten Zeitpunkt wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und in zwei Teilkulturen aufgeteilt. Es wurde auf die ursprüngliche Zelldichte resuspendiert. In der Kontrolle (C_1) fehlte dem Medium die Stickstoffquelle, in Medium A wurde sowohl die Stickstoffquelle, wie auch die Kohlenstoffquelle fortgelassen.

Da das Phänomen der Glykogenakkumulation auch bei anderen Hungerbedingungen als Stickstoffmangel auftreten kann, galt es sicherzustellen, daß in diesen Experimenten die beobachteten Resultate ausschließlich auf Stickstoffdefizienz zurückzuführen waren.

Unter der Voraussetzung, daß der Eintritt in die stationäre Wachstumsphase durch einen Mangel an Stickstoffquelle hervorgerufen wurde, wurden Zellen von B. amyloliquefaciens in einem Medium (pH 7,2) kultiviert, das keine Aminosäuren und als Stickstoffträger NH_4Cl (0,25 g/l) enthielt. Nachdem in der stationären Wachstumsphase ein konstanter Glykogengehalt pro Zelle festgestellt werden konnte, wurde dem Medium ein Überschuß an Stickstoffquelle (2 g/l NH_4Cl) zugegeben. Die Zugabe von Ammoniumchlorid zum Medium hob die Stagnation des Wachstums auf (Abb. 31). Dies war ein Indiz dafür, daß der frühe Eintritt der Kultur in die stationäre Wachstumsphase in der Tat durch einen Stickstoffmangel hervorgerufen wurde.

Wenn das Zellwachstum nach Zugabe der Stickstoffquelle zum Kulturmedium wieder begann, nahm der Gehalt an Glykogen in den Zellen sehr schnell ab. Obwohl das Verhältnis des Glykogens zu zellgebundenem Protein auf

Grund des steigenden Proteingehaltes der Zellen abnahm, ließ sich ebenso eine Verminderung der absoluten Mengen an Glykogen in den Zellen feststellen. Mit erneutem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase verlangsamte sich auch die Geschwindigkeit der Mobilisierung des Glykogens, um dann in der neuen stationären Phase wiederum an eine Phase des konstanten Glykogengehaltes pro Zelle anzuschließen.

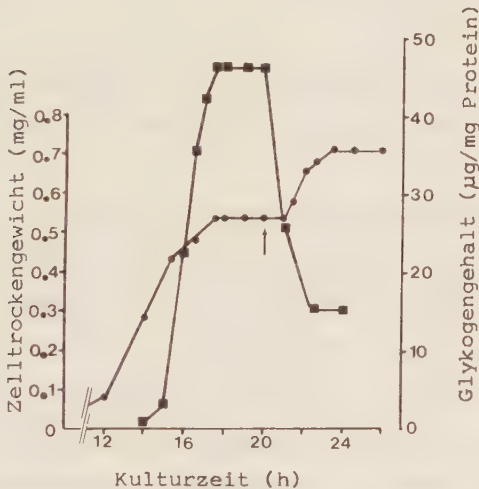


Abb. 31. Akkumulierung und Mobilisierung von Glykogen in B. amyloliquefaciens.

Die stationäre Wachstumsphase und daher Akkumulierung von Glykogen wurden durch Erschöpfung der Stickstoffquelle während des Wachstums des Bakteriums hervorgerufen (ca. 16 h in dieser Kultur). Zu dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt wurde NH_4Cl bis zu einer Konzentration von 2 g/l dem Medium zugesetzt. Kurz nach Zugabe der Stickstoffquelle begann das Wachstum erneut, und es trat eine Mobilisierung des Zellglykogens ein. ● Wachstum; ■ spezifischer

Glykogengehalt der Zellen.

6.3.4. Turnover von Glykogen

Sinn des folgenden Experimentes war es festzustellen, ob in der Zelle akkumuliertes Glykogen stoffwechselinaktiv abgelegt wird, oder ob es wie die meisten Zellbestandteile einem ständigen Auf- und Abbau (Turnover) unterliegt.

Zellen von B. amyloliquefaciens wurden durch die Beschränkung des Gehaltes an Stickstoffquelle im Medium zur Akkumulierung von Glykogen angeregt. Das Medium für diese Experimente enthielt keine Aminosäuren. Die Konzentration an NH_4Cl war auf 0, 25 g/l eingestellt worden. In der späten exponentiellen Wachstumsphase, in der Glykogen intrazellulär zu akkumulieren beginnt, wurde $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-Glucose}$ zum Kulturmedium zugegeben (spezifische Radioaktivität, 2 mCi/mmol; Endkonzentration der Radioaktivität im Medium, 1980 dpm/ml), und der Einbau von radioaktiver Glucose in akkumulierendes Glykogen wurde verfolgt. Die Kultur wurde 2 h nach Zugabe der radioaktiven Glucose in zwei Kulturen aufgeteilt (Abb. 32). In einer Teilkultur wurde den Zellen gestattet weiterhin $^{14}\text{C}\text{-Glucose}$ (Kontrolle, C_2) aufzunehmen, während in Experiment B radioaktive Glucose 1 : 200 mit unmarkierter Glucose verdünnt wurde (Endkonzentration, 0,2 mg/ml).

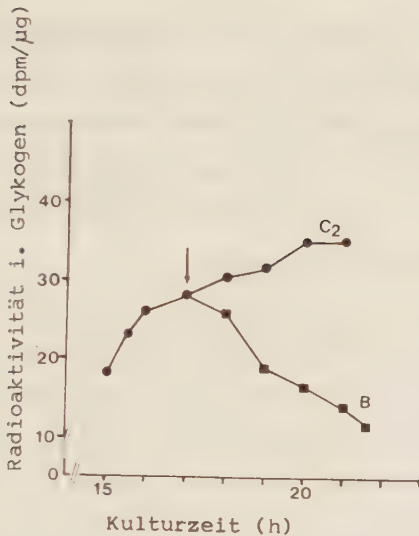


Abb. 32. Zeitlicher Verlauf der spezifischen Radioaktivität von Glykogen unter Kulturbedingungen, bei denen sowohl die Zelldichte wie die Menge an Glykogen pro Zelle konstant gehalten wurden (pulse chase-labeling Experiment). Eine Zellkultur von B. amyloliquefaciens wurde während der Aufnahme von radioaktiver Glucose geteilt (Pfeil). In der Kontrolle (C₂) wurde weiterhin ¹⁴C-Glucose aufgenommen, während in der Teilkultur B die radioaktive Glucose 1 : 200 mit unmarkierter Glucose verdünnt wurde.

Über einen Zeitraum von 4,5 h wurde die Radioaktivität von Glykogen in Zellen von B. amyloliquefaciens bestimmt. In Kultur C₂ (Kontrolle) wurde Radioaktivität aus ¹⁴C-Glucose kontinuierlich eingebaut, obwohl die Masse an Glykogen konstant blieb. Die Zellen aus Kultur B zeigten dagegen eine Abnahme der spezifischen Radioaktivität von Glykogen. Über 12 % der radioaktiven Glucose, die im

Medium vorhanden war, wurde in den Zellen 2 h nach der Zugabe der radioaktiven Glucose zum Medium gefunden. In Kultur C₂ wurden 15,1 % der radioaktiven Glucose 6 h nach der Aufnahme des Experimentes nachgewiesen. 78 % der totalen Radioaktivität in den Zellen wurde als ¹⁴C-Polyglucose erhalten.

Auf der Basis dieser Ergebnisse lassen sich folgende Aussagen machen : Akkumuliertes Glykogen in B. amylo-liquefaciens wird in den Zellen nicht passiv bis zu einer späteren Mobilisierung abgelegt, sondern unterliegt einem Turnover. Da der Gehalt an Glykogen pro Zelle bei konstanter Zelldichte nicht ab- oder zunimmt, müssen die relativen Geschwindigkeiten der Synthese und des Abbaues von Glykogen annähernd gleich sein.

7. Diskussion

7.1. Enzyme der α -Glucanverwertung in E. coli 8729, B. subtilis 6051 und 6633 und B. amylolique- faciens 23350

Wie die Ergebnisse der Untersuchung der drei Bakterienarten zeigten, bestehen erhebliche Unterschiede in der Ausstattung mit den Enzymen der α -Glucanverwertung. Für die noch nicht untersuchte Varietät von E. coli ließen sich die Ergebnisse von Palmer et al.³ und Palmer und Wöber⁵ voll reproduzieren, während sowohl B. subtilis 6051 und 6633, wie auch B. amyloliquefaciens 23350 einen anderen Satz an Enzymen zur Verwertung extrazellulärer α -Glucane benutzen. In beiden Bacillusarten konnte extrazellulär keine Pullulanase und weder Maltodextrin-Phosphorylase noch Amylomaltase intrazellulär nachgewiesen werden. Eine Besonderheit weist B. amyloliquefaciens dahingehend auf, daß dieser Organismus neben α -Amylase auch Isoamylase in das Kulturmedium sezerniert. Nach bestem Wissen des Autors der vorliegenden Arbeit ist dies das erstemal, daß eine solche Abweichung vom α -Glucanverwertungssystem bei einem Bakterium beobachtet wird. B. subtilis und B. amyloliquefaciens besitzen statt der beiden Komponenten des endogenen α -Glucanstoffwechsels, Amylomaltase und Maltodextrin-Phosphorylase, eine membrangebundene α -Glucosidase. Obwohl im Kulturmedium von B. subtilis kein Enzym gefunden wurde, das 1,6- α -glucosidische Bindungen spalten könnte, ist es dennoch

möglich, daß unter Umständen in die Zelle transportierte Isomaltose, 6²- α -Maltotriosylmaltose oder 6²- α -Glucosylmaltotriose etc, die durch den Angriff von α -Amylase auf verzweigte α -Glucane entstehen können, im beschränkten Maße von α -Glucosidase angegriffen werden können. Ähnliche Abweichungen bezüglich der intrazellulären Enzyme des α -Glucanabbaues sind bei Pseudomonas fluorescens beobachtet worden^{41,42}. Wenn in diesem Bakterium ebenfalls weder Amylomaltase noch eine Maltodextrin-Phosphorylase gefunden wird, wohl aber eine intrazelluläre α -Glucosidase, scheint es gerechtfertigt, die Vorstellung zurückzuweisen, daß es in Bakterien ein allgemeingültiges Stoffwechselschema der α -Glucanverwertung gibt. Es wird daher vorgeschlagen, daß in den beiden untersuchten Bacillusarten ein hydrolytischer Stoffwechselweg für den Abbau extrazellulärer α -Glucane unter Ausschluß intrazellulärer Maltodextrin-Phosphorylase und Amylomaltase beschritten wird, der die Enzyme Isoamylase, α -Amylase, Maltodextrin-Permease(n) und α -Glucosidase umfassen kann. Daß es zwischen den beiden Verwertungssystemen wahrscheinlich fließende Übergänge gibt, zeigt das Beispiel Klebsiella pneumoniae. In diesem Bakterium wurden sowohl Amylomaltase⁴³, eine 1,4- α -Glucan-Phosphorylase⁴⁴ und eine α -Glucosidase^{43,45} gefunden. Darüber hinaus synthetisiert dieses Bakterium Pullulanase³.

7.2. α -Glucosidase, ein membrangebundenes Enzym

Die Auswertung der Ergebnisse der differentiellen Zentri-

fugation von Zellhomogenaten und der Experimente mit Sphäroplasten zeigten, daß α -Glucosidase in den Bakterien B. subtilis 6051 und 6633 und in B. amyloliquefaciens mit der Membran assoziiert sind. Um die Natur der Bindung an Membranen und die physiologische Funktion dieses Enzymes besser verstehen zu können, schien es sinnvoll, α -Glucosidase von Membranen von B. amyloliquefaciens abzulösen. Über die Solubilisierung von Membranproteinen und die Wechselwirkung von Detergentien mit Membranen gibt es ausführliche Untersuchungen⁴⁶⁻⁴⁹.

Periphere Proteine können von Membranen durch komplexierende Agentien wie EDTA, durch Erniedrigung oder Erhöhung der Ionenstärke oder des pH des Extraktionsmediums abgelöst werden, ohne die Lipiddoppelschicht der Membran zu zerstören. Weiterhin sind periphere Proteine, die vermutlich hauptsächlich durch ionische Wechselwirkungen an die Membranlipide gebunden werden, nach der Extraktion wasserlöslich. Solubilisierete α -Glucosidase verlor nach intensiver Dialyse gegen Puffer in der Abwesenheit von Detergens vollständig ihre biologische Aktivität. Diese Aktivität konnte auch nicht durch die Zugabe von Detergentien wiederhergestellt werden. Die geringen Mengen an α -Glucosidase, die durch die Erhöhung der Ionenstärke des Extraktionsmediums von den Membranen im Vergleich mit den Resultaten mit Na-Cholat und Tween 85 abgelöst werden konnten, legten die Vermutung nahe, daß es sich bei α -Glucosidase aus B. amyloliquefaciens um ein fest gebundenes, integrales Membranprotein handelte.

Der denaturierende Effekt, den ionische Detergentien auf α -Glucosidase haben, ist ähnlich dem, der bei anderen integralen Membranproteinen beobachtet wurde⁴⁹. Membrangebundene Enzymaktivitäten können aktiviert, inaktiviert oder sogar durch Detergentien modifiziert werden^{46,50}. So wird die ATP-Synthese in Mitochondrien und Chloroplasten schon bei geringen Konzentrationen an Detergens entkoppelt, Transportmechanismen werden beeinflusst und das Verhalten der Membran als Permeationsbarriere gegenüber hydrophilen Substanzen wird verändert. Ein Anstieg der Detergentienkonzentration kann in einer Erhöhung der Permeabilität der Vesikel für Substrate und Produkte seinen Niederschlag finden und von daher eine Änderung der Testbedingungen für vesikuläre Enzyme bedingen.

Da solubilisierter α -Glucosidase recht instabil erschien, wurde von der hohen Stabilität vesikulärer α -Glucosidase Gebrauch gemacht, um zunächst Begleitprotein zu entfernen. Es erwies sich als wesentlich zweckmäßiger, α -Glucosidaseenthaltende Vesikel zu reinigen, als sich mit den Implikationen der Reinigung eines solubilisierten Proteins über mehrere Anreicherungsschritte hinweg zu beschäftigen.

7.3. Vergleich der B. amyloliquefaciens α -Glucosidase mit ähnlichen Enzymen verschiedenen Ursprungs

Obwohl α -Glucosidasen verschiedener Herkunft ausführlich untersucht worden sind, ist sehr wenig über membrangebundene α -Glucosidasen bekannt. Über die Sekretion ex-

trazellulärer Maltasen wurde zum Beispiel bei B. subtilis P-11⁵¹ und einem thermophilen Bacillus KP 1035⁵² berichtet. Im Gegensatz dazu wurden die α -Glucosidasen aus Ps. fluorescens⁵³, Myxobacter AL-1⁵⁴, B. cereus⁵⁵ und Streptococcus pyogenes⁵⁶ als cytoplasmatische und die α -Glucosidase aus Bacillus KP 1006⁵⁷ als extrazelluläre Enzyme charakterisiert. Maltasen und α -Glucosidasen unterschieden sich stark hinsichtlich der Substratspezifität, des pH-Optimums, des Temperatur-Optimums und des Molekulargewichtes. Trotz dieser großen Abweichungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften bei den untersuchten Enzymen waren alle, einschließlich der α -Glucosidase von Mucor javanicus und Saccharomyces cerevisiae, lösliche Enzyme^{58,59}. Wenn vermutet werden kann, daß auf Grund der in den meisten Fällen nur oberflächlichen Reinigung einige der als lösliche Proteine bezeichneten α -Glucosidasen tatsächlich vesikuläre Enzyme waren, so beschreibt die vorliegende Arbeit erstmals eine membrangebundene α -Glucosidase bakteriellen Ursprungs. In Tabelle 7 sind einige α -Glucosidasen und Maltasen verschiedenen Ursprungs mit ihren bevorzugten Substraten zusammengefaßt.

In Übereinstimmung mit den von Gottschalk⁶⁰ aufgestellten Definitionen ist B. amyloliquefaciens α -Glucosidase eine echte α -Glucosidase, da sie nur Substrate hydrolysiert, die eine α -Konfiguration am C-Atom 1 des Glykonrestes besitzen. p-Nitrophenyl- β -D-glucosid wurde daher von diesem Enzym nicht angegriffen. In seiner Eigenschaft, p-Nitrophenyl- α -D-glucosid und Saccharose schneller

als Maltose hydrolisieren zu können, ähnelt diese α -Glucosidase eher entsprechenden Enzymen aus Hefen^{60,61} als α -Glucosidasen aus anderen Bakterien^{51-57,62,63}.

Tabelle 7. Bevorzugte Substrate einiger α -Glucosidasen und Maltasen aus Mikroorganismen

Organismus	Sacch.	Mal.	Meth.-glc	N.-ph.-glc	Ref.
<u>B. cereus</u>		+			55
<u>B. subtilis</u>		+			51
<u>B. subtilis</u>			+	+	62
<u>B. subtilis</u>				+	
<u>Bacillus</u> KP 1006				+	57
<u>Bacillus</u> 1035		+			52
<u>B. amylolique-</u> <u>faciens</u>	+				
<u>K. pneumoniae</u>		+			45
<u>Ps. fluores-</u> <u>cens</u>				+	53
<u>Myxobacter</u> AL-1				+	54
<u>M. javanicus</u>		+			58
<u>S. cerevisiae</u>	+	+			59
<u>S. cerevisiae</u>	+		+		60,61
<u>Pseudomonas</u> SB 15				+	63
Gerste		+			64

Zeichenerklärung zu Tabelle 7 : Sacch.= Saccharose;
Mal.= Maltose; Meth.-glc= Methyl- α -glucosid; N.-ph.-
glc= p-Nitrophenyl- α -D-glucosid; Ref= Referenzliteratur.

Keine andere α -Glucosidase der Gattung Bacillus hat, soweit untersucht, die Fähigkeit, Saccharose zu hydrolysieren, aber einige besitzen eine Substratspezifität für Methyl- α -glucosid, die B. amyloliquefaciens und die untersuchten Stämme B. subtilis 6051 und 6633 nicht aufweisen.

7.4. Physiologische Funktion der α -Glucosidase beim α -Glucanabbau in B. amyloliquefaciens

Wie sich bei den Wachstumsexperimenten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen herausstellte, waren die absoluten Aktivitäten der α -Glucosidase in Zellen, die auf Kohlehydraten gewachsen waren, wesentlich höher, als die in Zellen, die nicht auf Kohlehydraten gewachsen waren. Dieser Effekt wird auf eine graduelle Induktion des Enzymes zurückgeführt. Der niedrige Spiegel an α -Glucosidaseaktivität in Zellen, die auf Glucose gewachsen waren und die schnelle Abnahme der spezifischen Aktivität in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, wenn die Zellen auf α -Glucanen wuchsen, kann vermutlich mit Katabolitenrepression des Enzymes erklärt werden. Die extrazellulären Enzyme Isoamylase und α -Amylase werden in das Kulturmedium sezerniert, bevor in den Membranen des Bakteriums aktive α -Glucosidase entdeckt werden kann. Durch den gleichzeitigen Angriff von α -Amylase und Isoamylase werden lineare und verzweigte α -Glucane zu Maltodex-

trinen, Maltose und Glucose abgebaut. Maltodextrine und Maltose können dann von der membrangebundenen α -Glucosidase hydrolysiert werden, während dann die Produkte der Reaktion durch eine noch nicht charakterisierte Permease in das Cytoplasma transportiert werden. Wegen des Fehlens einer Maltodextrin-Phosphorylase und einer Amylomaltase in der exponentiellen Wachstumsphase muß α -Glucosidase als ein Enzym des endogenen α -Glucanstoffwechsels in B. amyloliquefaciens und B. subtilis 6051 und 6633 angesehen werden.

7.5. Sekretion extrazellulärer Polysaccharide

Von einigen Autoren ist die Isolierung und Charakterisierung extrazellulärer Polysaccharide aus dem Kulturmedium von Bakterien beschrieben worden^{7,8,65,66}. Die mutmaßliche physiologische Funktion eines mit Protein kosezernierten, extrazellulären Polysaccharides wurde erstmals bei Micrococcus sodonensis untersucht⁸. Danach scheint es so zu sein, daß erst ein sezerniertes Polysaccharid die Voraussetzung für die Sekretion von Proteinen und das Auffinden aktiver Enzyme im Kulturmedium der Bakterien schafft. Wie die Versuche zur Inhibierung der Polysaccharidsekretion in B. amyloliquefaciens zeigten, kann das Auftreten von aktiver Isoamylase im Medium durch Zugabe von 2-Desoxyglucose wirksam unterbunden werden. Zwei Hypothesen bieten sich zur Erklärung dieses Phänomens an. Erstens ist es möglich,

daß kosezerniertes Polysaccharid dem Protein die Überwindung der hydrophoben Membran möglich macht, während ohne Polysaccharid eine Sekretion des nativen Polypeptidstranges unterbleibt. Zweitens ist denkbar, daß das Polysaccharid im Medium eine Schutzfunktion für den noch ungefalteten, naszierenden Polypeptidstrang besitzt. Wird vermindert das spezifische Polysaccharid sezerniert, ist das Enzymprotein verstärkt dem Angriff von Proteasen im Medium ausgesetzt.

Betrachtet man die Inhibierung der Protein- und Polysaccharidsynthese in Abhängigkeit vom Zelltrockengewicht, so fällt auf, daß bei einem Rückgang des Zelltrockengewichtes um 26 % bei Anwesenheit von 0,9 mg/ml 2-Desoxyglucose im Medium die Polysaccharidsekretion um 18 % inhibiert wird. Das heißt, der minimale Effekt von 7 % Inhibierung der Polysaccharidsynthese bewirkt eine 100 %ige Inhibierung der Isoamylase. Die relativen Masseverhältnisse von Isoamylase zu α -Amylase von 10-15 % im Kulturmedium stehen allerdings mit der Inhibierung der Isoamylase und dem Rückgang der Proteinsekretion von 18 % in gutem Einklang. Die Inhibierungsexperimente, ebenso wie die Reinigung des Polysaccharides bestätigen, daß es für die untersuchten Enzyme spezifische Polysaccharide gibt, deren Synthese sensitiv gegenüber einer Inhibierung durch 2-Desoxyglucose ist. Worauf allerdings die relative Stimulierung der Protein- und Polysaccharidsynthese zurückzuführen ist, konnte noch nicht geklärt werden. Es wäre denkbar, daß durch die Inhibierung der Polysaccharidsekretion Proteine verstärkt im Medium durch Proteasen abgebaut

werden und es durch den Transport der Produkte in das Zellinnere zu einer Katabolitrepression der Proteasensekretion kommt. Da jedoch nicht genügend Polysaccharid im Medium vorhanden ist, das vor der Faltung zum nativen Polypeptid essentiell ist, kann im Medium auch kein aktives Enzymprotein gefunden werden. Weiterhin liegt die Konzentration an 2-Desoxyglucose im Medium unter der Konzentration an Glucose, die eine Repression der Enzyme des α -Glucanstoffwechsels bewirken könnte, sodaß die extrazellulären α -Glucane nicht oder nur geringfügig im Falle einer Inhibierung abgebaut werden. Interessant ist auch das Ergebnis der Untersuchung der Maltoseverwertung im Zusammenhang mit der Inhibierung der α -Glucosidasesynthese. Dem verminderten Schutz des sezernierten Polypeptidstranges vor dem Angriff durch Proteasen und der möglicherweise verminderten Sekretion des Proteins an sich scheint ein weiterer Effekt überlagert zu sein. Da α -Glucosidase für den weiteren Stoffwechsel von Maltodextrinen und Maltose im Zellinnern verantwortlich ist, könnte eine Verminderung der Zellausbeuten und damit ein partieller Rückgang der Polysaccharid- und der Proteinsekretion erklärt werden.

7.6. Reservekohlehydrat in B. amyloliquefaciens

Die Rolle von α -Glucanen als Energie- und Kohlenstoffquelle während der Sporenreifung bei gram-positiven Bakterien der Gattung Bacillus ist ausführlich untersucht worden^{67,68,11,13}. Obwohl der Sporentiter in der

späten stationären Wachstumsphase in den einzelnen Experimenten nicht bestimmt wurde, kann angenommen werden, daß die zu beobachtende leichte Abnahme des Glykogengehaltes in der späten stationären Phase auf eine beginnende Sporulation zurückzuführen ist. Da jedoch die Funktion des Glykogens in B. amyloliquefaciens während der Sporulation des Bakteriums nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, wurde dieser Aspekt der Glykogenmobilisierung nicht weiter untersucht. Es ging vielmehr darum zu zeigen, daß Glykogen in dem untersuchten Organismus eine mehr generelle Funktion als leicht verfügbare Kohlenstoffquelle unter zeitlich begrenzten Hungerbedingungen verschiedenster Natur hat. Intrazellulär akkumuliertes Glykogen war in B. amyloliquefaciens stoffwechsellabil analog zu dem Reservepolysaccharid des photoautotrophen Bakteriums Ana-cystis nidulans¹⁶. Diese Annahme stützt sich auf die Tatsache, daß während der laufenden Phase der Akkumulation von Glykogen in B. amyloliquefaciens stets ein Überschuß von Maltose oder einer anderen Kohlehydratquelle im Medium vorhanden war, deren Konzentration auch während der stationären Wachstumsphase noch abnahm. Der aus Maltose entstandene intrazelluläre Glucosespiegel dürfte hoch genug sein, um wirksam eine Sporulation der vegetativen Zellen zu unterdrücken. Darüber hinaus wurde bei Experimenten mit radioaktiver Glucose dem Medium immer nicht-radioaktive Glucose zugesetzt.

7.7. Turnover von Glykogen in B. amyloliquefaciens

Die Frage, ob in einem heterotrophen Bakterium akkumuliertes Glykogen kontinuierlich synthetisiert und abgebaut wird, oder ob es aber in der Zelle unberührt bis zur späteren Mobilisierung abgelegt wird, konnte durch den Nachweis eines Turnovers des Glykogens durch " pulse chase-labelling " Experimente geklärt werden. Auf Grund dieses erstmalig nachgewiesenen Turnovers von Glykogen in einem heterotrophen Bakterium kann angenommen werden, daß die relativen Geschwindigkeiten der Synthese und des Abbaues des Glykogens in B. amyloliquefaciens strikt reguliert sind.

8. Abschließende Zusammenfassung

B. amyloliquefaciens besitzt die Fähigkeit, bei Anwesenheit von α -Glucanen in seiner Umgebung einen Satz von Enzymen zu synthetisieren, der in der Lage ist, diese α -Glucane abzubauen und deren Abbauprodukte in den Intermediärstoffwechsel einzuschleusen. Diese Enzyme für den Abbau von extrazellulären α -Glucanen sind Isoamylase und α -Amylase, die unter physiologischen Bedingungen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase des Bakteriums in das Kulturmedium sezerniert werden, eine membran-gebundene, noch nicht charakterisierte Permease und eine intrazelluläre, ebenfalls membrangebundene α -Glucosidase. Ein Teil der aus diesen α -Glucanen entstandene Glucose wird von dem Bakterium für die Synthese von Polysacchariden

verwendet, die essentiell für die Sekretion der extrazellulären Enzyme sind. Zusammen mit den extrazellulären Enzymen werden diese Polysaccharide kosezerniert und ermöglichen mutmaßlich den nativen Enzymproteinen erst die Überwindung der hydrophoben Membran. Eine Beeinträchtigung der Polysaccharidsynthese führt zu abnehmender Enzymaktivität im Kulturmedium des Bakteriums. In der späten exponentiellen Wachstumsphase und der frühen stationären Phase wird die aus α -Glucanen stammende Glucose neben anderen Stoffwechselprozessen für die Synthese eines Reservekohlehydrates verwendet, dessen Gehalt pro Zelle bis zur Abnahme der Zelldichte in der späten stationären Wachstumsphase konstant bleibt. Dieses Reservekohlehydrat ist stoffwechsellabil und wird unter zeitlich begrenzten Hungerbedingungen mobilisiert. Akkumuliertes Reservekohlehydrat in B. amyloliquefaciens wird in der Zelle nicht unberührt abgelegt, sondern durchläuft einen ständigen Prozeß des Abbaues und der Resynthese. Da der Gehalt an Glykogen pro Zelle in der Phase des ständigen Abbaues und der Resynthese konstant bleibt, muß dieser " Turnover " strikt reguliert sein.

9. Literaturzitate

1. Norrman, J. und Wöber, G. (1975) Maltodextrin catabolism in Ps. amyloclavata and Ps. saccharophila. Arch. Microbiol. 102, 253-260.
2. Wöber, G. (1973) The pathway of maltodextrin metabolism in Ps. stutzeri. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 75-82.
3. Palmer, T. N., Wöber, G. und Whelan, W. J. (1973) The Pathway of exogenous and endogenous carbohydrate in E. coli. Eur. J. Biochem. 39, 601-612.
4. Urlaub, H. und Wöber, G. (1975) Identification of isoamylase, a glycogen-debranching enzyme, from B. amyloliquefaciens. FEBS-Lett. 57, 1-4.
5. Palmer, T. N. und Wöber, G. (1975) The metabolic role of debranching enzymes. Biochem. Soc. Trans. 3, 53-56.
6. Welker, R. S. und Campbell, L. L. (1967) Unrelatedness of B. amyloliquefaciens and B. subtilis. J. Bacteriol. 94, 1124-1130.
7. Glew, R. H. und Heath, E. C. (1971) Studies on the extracellular alkaline phosphatase of M. sodonensis. J. Biol. Chem. 246, 1566-1574.
8. Braatz, J. A. und Heath, E. C. (1974) The role of polysaccharide in the secretion of protein by M. sodonensis. J. Biol. Chem. 249, 2536-2547.
9. Preiss, J. (1969) The regulation of the biosynthesis of α -1,4-glucan in bacteria and plants. Curr. Top. Cell. Reg. 1, 125-160.
10. Dawes, E. A. und Ribbons, D.W. (1964) Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. Bact. Rev. 28, 126-149.
11. Strasidine, G. A. (1972) The role of intracellular glucan in endogenous fermentation and spore maturation in C. botulinum, type E. Can. J. Microbiol. 18, 211-217.

12. Robson, R. L. und Morris, J. G. (1974) Mobilization of granulose in C. pasteurianum. Biochem. J. 144, 513-517.
13. Slock, J. A. und Stahly, D. P. (1974) Polysaccharide that may serve as a carbon and energy storage compound for sporulation in B. cereus. J. Bact. 120, 399-406.
14. Eidels, L., Edelmann, P. L. und Preiss, J. (1970) Biosynthesis of bacterial glycogen. Arch. Biochem. Biophys. 140, 60-74.
15. Goldemberg, S. H. (1972) Glucan biosynthesis in B. stearrowthermophilus. Arch. Biochem. Biophys. 149, 252-258.
16. Lehmann, M. und Wöber, G. (1976) Accumulation, mobilization and turnover of glycogen in the blue-green bacterium A. nidulans. Arch. Microbiol. 111, 93-97.
17. Schoch, T. J. (1957) Preparation of starch and the starch fractions. Methods. Enzymol. 3, 11-12.
18. Lehmann, M. und Wöber, G. (1977) [$U-^{14}C$]-Labelled glycogen, maltodextrin mixture, maltose or glucose: Preparation by photoassimilation of $^{14}CO_2$ in A. nidulans. Carbohydr. Res. 56, 357-362.
19. Fleming, J. D. und Stone, B. A. (1965) Fractionation of Aspergillus niger amyloglucosidase. Biochem. J. 97, 13P.
20. Bernfeld, P. (1955) α and β -Amylases. Methods. Enzymol. 154-158.
21. Marshall, J. J. und Whelan, W. J. (1973) Removal of α -glucosidase impurity from crystalline sweet-potato β -amylase. Anal. Biochem. 52, 642-646.
22. Gunja-Smith, Z., Marshall, J. J. und Smith, E. E. (1971) Enzymic determination of the unit chain length of glycogen and related polysaccharides. FEBS-Lett. 13, 309-311.
23. Chen, G. S. und Segel, I. H. (1968) E. coli polyglucose phosphorylase. Arch. Biochem. Biophys. 127, 164-174.
24. Tagaaki, T. H., Toda, H. und Isumura, T. (1971) Bacterial and mold amylases, in: The Enzymes, Vol. V., 235-271, Boyer, P. D. eds.

25. Bender, H. (1970) Pullulanase von Aerobacter aerogenes. Arch. Microbiol. 71, 331-352.
26. Robyt, J. F. und Whelan, W. J. (1968) in: Starch and its derivatives, Radley, J. A. ed. 430-476, Chapman and Hall, London.
27. Nelson, J. (1944) A photometric adaptation of the Somogy-method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.
28. Loyd, I. B. und Whelan, W. J. (1969) An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. Anal. Biochem. 30, 467-470.
29. Palmer, T. N., Ryman, B. E. und Whelan, W. J. (1968) The action pattern of amylomaltase. FEBS-Lett. 1, 1-3.
30. Lowry, D. H., Roseborough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
31. Layne, E. (1966) Protein measurement by ultraviolet absorption. Methods. Enzymol. 7, 451-454.
32. Krisman, C. R. (1962) A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. Anal. Biochem. 4, 17-24.
33. Stormonth, B. A. und Coleman, G. (1972) A rapid and convenient method for determining the dry weight content of bacteria which show a tendency to form large aggregates. J. gen. Microbiol. 71, 407-408.
34. Williams, D. E. und Reisfeld, R. A. (1964) Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffer. Ann. N. Y. A. Sci. 121, 373-381.
35. Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis Part II. Ann. N. Y. A. Sci. 121, 404-427.
36. Marshall, J. J. und Whelan, W. J. (1970) Incomplete conversion of glycogen and starch by cristalline amyloglucosidase. FEBS-Lett. 9, 85-88.
37. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. und Smith, F. (1956) Colorimetric determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

38. Lee, E. Y. C. und Whelan, W. J. (1966) Enzymic method for the microdetermination of glycogen and amylopectin, and their unit-chain lengths. Arch. Biochem. Biophys. 116, 162-167.
39. Robyt, J. und French, D. (1963) Action pattern and specificity of an α -amylase from B. subtilis. Arch. Biochem. Biophys. 100, 451-467.
40. Urlaub, H. (1975) Isoamylase und α -Amylase: zwei Enzyme des α -Glucanstoffwechsels in B. amyloliquefaciens ATCC 23350. Diplomarbeit, Marburg.
41. Guffanti, A. A. und Corpe, W. A. (1975) Maltose metabolism of Ps. fluorescens. J. Bact. 124, 262-268.
42. Guffanti, A. A. und Corpe, W. A. (1976) Transport of maltose by Ps. fluorescens W. Arch. Microbiol. 108, 75-83.
43. Hope, G. C. und Dean, A. C. R. (1974) Pullulanase synthesis in Klebsiella (Aerobacter) aerogenes strains growing in continuous culture. Biochem. J. 144, 403-411.
44. Linder, D., Kurz, G., Bender, H. und Wallenfels, K. (1976) 1,4- α -Glucan phosphorylase from K. pneumoniae. Purification, subunit structure and amino acid composition. Eur. J. Biochem. 70, 291-303.
45. Barker, S. A., Hopton, J. W., Somers, P. J. und Repas, A. (1966) Carbohydrate specificity of inducible K. aerogenes glucosidases. Carbohydr. Res. 3, 230-234.
46. Razin, S. (1972) Reconstitution of biological membranes. Biochim. Biophys. Acta. 265, 241-296.
47. Coleman, R. (1973) Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta. 300, 1-30.
48. Tanford, C. und Reynolds, J. A. (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solutions. Biochim. Biophys. Acta. 457, 133-170.
49. Helenius, A. und Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta. 415, 29-79.
50. Kagawa, Y. (1972) Reconstitution of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta. 265, 297-338.

51. Wang, L.-H. und Hartman, P. A. (1976) Purification and some properties of an extracellular maltase from B. subtilis. Appl. Environ. Microbiol. 31, 108-118.
52. Suzuki, Y., Tsuji, T. und Shigeo, A. (1976) Production of an extracellular maltase by thermophilic Bacillus sp. KP 1035. Appl. Environ. Microbiol. 32, 747-752.
53. Guffanti, A. A. und Corpe, W. A. (1976) Partial purification and characterization of alpha-glucosidase from Ps. fluorescens W. Arch. Microbiol. 107, 269-276.
54. Guntermann, U., Tan, I. und Hüttermann, A. (1975) Induction of α -glucosidase and synthesis during the cell cycle of Myxobacter AL-1. J. Bact. 124, 86-91.
55. Yamasaki, Y. und Suzuki, Y. (1974) Purification and properties of α -glucosidase from B. cereus. Agr. Biol. Chem. 38, 443-454.
56. Doolin, L. E. und Panos, C. (1969) The α -glucosidase of S. pyogenes and derived L-form. Biochim. Biophys. Acta. 184, 271-280.
57. Suzuki, Y., Kishigami, T. und Shigeo, A. (1976) Production of extracellular α -glucosidase by a thermophilic Bacillus species. Appl. Environ. Microbiol. 31, 807-812.
58. Yamasaki, Y., Miyake, T. und Suzuki, Y. (1973) Properties of crystalline α -glucosidase from Mucor javanicus. Agr. Biol. Chem. 37, 251-259.
59. Khan, N. A. und Eaton, N. R. (1967) Purification and characterization of maltase and α -methyl glucosidase from yeast. Biochim. Biophys. Acta. 146, 173-180.
60. Gottschalk, A. (1950) α -D-Glucosidases. in The enzymes, Vol. I. Sumner, J. B. and Myrbach, K. B. eds. Academic Press, New York.
61. Chiba, S., Saeki, T. und Shimomura, T. (1973) Purification and some properties of Saccharomyces logos α -glucosidase. Agr. Biol. Chem. 37, 1823-1829.
62. Schmalreck, A. F., Losher, H. und Teuber, M. (1975) Uptake and inducible degradation of methyl- α -D-glucos-

- pyranoside and maltose by B. subtilis. Biochem. Soc. Trans. 3, 1004-1006.
63. Sugimoto, T., Amemura, A. und Harada, T. (1974) Formations of extracellular isoamylase and intracellular α -glucosidase and amylase(s) by Pseudomonas SB 15 and a mutant strain. Appl. Microbiol. 28, 336-339.
64. Jorgensen, B. B. und Jorgensen, O. B. (1967) Inhibition of barley malt α -glucosidase by tris(hydroxymethyl)amino-methane and erythritol. Biochim. Biophys. Acta. 146, 167-172.
65. Dellweg, M. J. und Förster, B. (1975) Characterization of an extracellular polysaccharide from Ps. stutzeri. Eur. J. Microbiol. 3, 307-312.
66. Dudman, W. F. (1976) The extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum: compositional studies. Carbohydr. Res. 46, 97-110.
67. Gabriel, O. und Wang, S.-F. (1969) Determination of enzymic activity in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 27, 545-554.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
März 1975 bis August 1977 im Fachgebiet Bio-
chemie am Fachbereich Chemie durchgeführt.

Herrn Dozent Dr.-G. Wöber

danke ich für die Anregung zu der vorliegenden
Arbeit, für sein stetes Interesse und seine
wertvolle Beratung.

Lebenslauf

Name:	Herbert Urlaub
Geburtsdatum:	06. Oktober 1948
Geburtsort	Schwerte/Ruhr/Westfalen
Eltern:	Bauingenieur Walter Urlaub und Ilse Urlaub, geb. Scholz, Hausfrau
Ehefrau:	Sylvelie Urlaub, geb. Siedentopf
1955-1959	Volksschule in Dortmund
1959-1968	math. naturw. Leibniz-Gymnasium in Dortmund (Abitur)
Oktober 1968	Immatrikulation an der Universität Köln
Sommersemester 1971	Universität Dortmund (Vordiplom- prüfung in Chemie)
Sommersemester 1972	Philipps-Universität Marburg
März 1974	Hauptdiplomprüfung in Chemie
seit März 1974	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Dozent Dr. G. Wöber
seit März 1975	Anfertigung der Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Dr. G. Wöber
seit März 1975	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft m. A.
seit September 1976	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter



